T.C
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YENİ SENTEZLENMİŞ BİR TİYOSEMİKARBAZON TÜREVİNİN KANSER HÜCRELERİNİN ÇOĞALMASI VE HAREKETİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Pelin MÜJDECİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2018

Dr. Öğr. Ü. Hatice AKTAŞ danışmanlığında, Pelin MÜJDECİ'nin hazırladığı **"Yeni Sentezlenmiş bir Tiyosemikarbazon Türevinin Kanser Hücrelerinin Çoğalması ve Hareketi Üzerine Etkileri"** konulu bu çalışma 16/03/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

İmza

Danışman : Dr. Öğr. Ü. Hatice AKTAŞ .....

Üye : Prof. Dr. Faruk SÜZERGÖZ .....

Üye : Dr. Öğr. Ü. Ulaş ALABALIK .....

Bu Tezin Biyoloji Anabilim Dalında Yapıldığını ve Enstitümüz Kurallarına Göre Düzenlendiğini Onaylarım.

Prof. Dr. Halil Murat ALGIN
Enstitü Müdürü

T.C. HARRAN ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ 1923

Bu Çalışma HÜBAK tarafından desteklenmiştir.
Proje No: 15185

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirilişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
ŞEKİLLER DİZİNİ iv
ÇİZELGELER DİZİNİ v
SİMGELER DİZİNİ vi
1.GİRİŞ 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 3
2.1. Kanser 3
2.2. Prostat Bezi 4
2.2.1. Prostat bezinin anatomisi 4
2.2.2. Prostat bezinin embriyolojisi 5
2.2.3. Prostat bezinin fizyolojisi 5
2.2.4. Prostat bezinin histolojisi 5
2.3. Prostat Kanseri 6
2.4. Prostat Kanserinde Metastaz, Migrasyon ve İyon Kanalları 8
2.4.1. Metastaz ve migrasyon 8
2.4.2. İyon kanalları 10
2.4.2.1. Voltaj kapılı sodyum kanalları 10
2.5. Dunning Modeli Sıçan Prostat Kanseri Hücreleri: MAT-LyLu 13
2.6. Tetrodotoksin (TTX) 13
2.7. Tiyosemikarbazonlar 15
2.7.1. Tümör büyümesinin engellenmesi 17
2.7.2. İlaç direncinin engellenmesi 17
2.7.3. Metastazın inhibisyonu 18
3. MATERYAL ve YÖNTEM 19
3.1. Materyal 19
3.2. Yöntem 20
3.2.1. Hücre kültürü 20
3.2.2. Deney mediumlarının hazırlanması 20
3.2.3. Toksisite 21
3.2.4. Hücre kinetiği parametreleri 22
3.2.4.1. Hücre proliferasyonu 22
3.2.4.2. Mitoz indeksi 22
3.2.5. Motilite analizi (yara kapanma yöntemi) 23
3.2.6. İstatistiksel değerlendirme 24
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA 25
4.1. Araştırma Bulguları 25
4.1.1. Toksisite 25
4.1.2. Hücre kinetiği üzerindeki etkiler 26
4.1.2.1. Proliferasyon 26
4.1.2.2. Mitoz indeksi 29
4.1.3. Hücre hareketi üzerindeki etkiler 31
4.2. Tartışma 33
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER 37
KAYNAKLAR 39
ÖZGEÇMİŞ 51

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

YENİ SENTEZLENMİŞ BİR TİYOSEMİKARBAZON TÜREVİNİN KANSER HÜCRELERİNİN ÇOĞALMASI VE HAREKETİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Pelin MÜJDECİ

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Hatice AKTAŞ
Yıl:2018, Sayfa: 51

Kanser, ülkemizde ve dünyada önemli bir halk sağlığı problemidir. Prostat kanseri erken dönemde belirti vermez ve hastalık teşhis edildiğinde hastaların çoğu metastaz sürecine geçmiş bulunmaktadır. Kanser hücreleri ile yapılan çok sayıda çalışma, voltaj kapılı sodyum kanallarının (VGSC) metastatik sürecin hemen hemen tüm basamaklarında rol oynadığını göstermiştir. Bu kanalların artmış ekspresyonunun prostat kanserinde de metastazları başlattığı ve kuvvetlendirdiği tespit edilmiştir. Kanser tedavisi için çok çeşitli kemoterapötik maddeler kullanılmaktadır. Fakat kanser, bireye özgü bir hastalıktır ve bu nedenle yeni ve özgün bileşiklerin üretilerek olası antitümöral ve antimetastatik özellikler bakımından test edilmeleri gereklidir. Bu tez çalışmasında, yeni sentezlenmiş bir Tiyosemikarbozon türevi olan 3, 5 – di – tert – butyl salicylaldehyde – S – methyl thiosemicarbazone (3,5 DTBSA-5-Me-TSC) bileşiğinin, Dunning modeli sıçan prostat kanseri MAT-LyLu hücreleri üzerindeki biyolojik etkilerinin hücre kinetiği (proliferasyon ve mitotik aktivite) ve hücre migrasyonu bakımlarından incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla öncelikle, Tripan mavisi analizi ile toksik olmayan bileşik konsantrasyonu belirlenmiştir. Ardından bileşiğin (0.1–15 μM) hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri MTT yöntemiyle, mitotik aktivite üzerindeki etkiler ise mitoz indeksinin belirlenmesiyle ölçülmüştür. Hücre proliferasyonu üzerinde etki göstermeyen konsantrasyonlardaki 3,5 DTBSA-5-Me-TSC'nin hücrelerin lateral yöndeki hareketleri üzerindeki etkileri yara iyileşme analizi ile tespit edilmiştir. MAT-LyLu hücreleri üzerine 48 saat süreyle uygulanan 3,5 DTBSA-5-Me-TSC bileşiği sadece çalışılan en yüksek (15 μM) konsantrasyonda proliferasyonu inhibe etmiş, mitotik aktivite üzerinde herhangi bir etki oluşturmamıştır. Bileşik (5 ve 10 μM), 48 saat süreyle uygulandığında MAT-LyLu hücrelerinin hareket ettiği mesafeyi azaltmıştır. Sonuç olarak, 3,5 DTBSA-5-Me-TSC bileşiğinin yüksek konsantrasyonlarının antiproliferatif, düşük konsantrasyonlarının ise VGSC blokeri antimetastatik ajan olarak değerlendirilme potansiyelinin bulunduğu ortaya çıkmıştır. Bileşiğin sergilediği bu biyolojik aktivitelerin temelinde yatan mekanizmaların aydınlatılması için ileri moleküler araştırmalar yapılmalıdır.

ANAHTAR KELİMELER: Prostat kanser hücreleri, tiyosemikarbazon, voltaj kapılı sodyum kanalı, motilite, antitümöral etki

ABSTRACT

MSc Thesis

EFFECTS OF A NEW SYNTHESIZED THIOSEMICARBAZONE DERIVATIVE ON THE PROLIFERATION AND MOTILITY OF CANCER CELLS

Pelin MÜJDECİ

Harran University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Hatice AKTAŞ
Year: 2018, Page: 51

Cancer is a major health problem in our country and in the world. Prostate cancer does not show early symptoms, and when diagnosed it, metastatic process has been started in most patients. Numerous studies on cancer cells have shown that voltage-gated sodium channels play a role in almost all stages of the metastatic process. Overexpression of these channels has also been shown to initiate and potentiate metastases in prostate cancer. There are a wide variety of chemotherapeutic agents used for cancer treatment. However, cancer is an individual patient's disease, and therefore new and unique compounds must be produced and tested in point of their possible antitumoral and antimetastatic properties. In this thesis, it was aimed to investigate the biologic activity on MAT-LyLu cells of a new synthesized thiosemicarbazone derivative, 3,5 - di - tert - butyl salicylaldehyde - S - methyl thiosemicarbazone (3,5 DTBSA - 5 - Me - TSC), in terms of cell kinetics (proliferation and mitotic activity), and cell migration. For this purpose, firstly, the non-toxic concentrations of this compound was determined by trypan blue dye exclusion assay. Then, it was measured that the effects of this compound (0.1-15 μM) on the cell proliferation, and on the mitotic activity by using MTT method and determining the mitosis index, respectively. The effects of 3,5 DTBSA-5-Me-TSC on lateral movements of the cells were determined by wound healing assay at concentrations not affecting cell proliferation. Treatment of the compound 3,5 DTBSA - 5 - Me - TSC on MAT-LyLu cells for 48 hours inhibited the proliferation only at the highest concentration (15 μM), whereas it had no effect on mitotic activity. The compound (5 and 10 μM) reduced the movement distance of MAT-LyLu cells, when applied for 48 h. In conclusion, it was revealed that the 3,5 DTBSA-5-Me-TSC compound has potential activities as antiproliferative at high concentrations, and might evaluate as antimetastatic agent blocking VGSCs at low concentrations. Further molecular investigations should be done to elucidate the mechanisms underlying these biological activities of this compound.

.

KEYWORDS: Prostate cancer cells, thiosemicarbazone, voltage gated sodium channel, motility, antitumoral effect

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez aşamam boyunca, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yüksek sabır ve özveri gösteren her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen çok değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Hatice AKTAŞ'a,

Hücre kültürlerin kurulması aşamasında Dunning modeli sıçan prostat kanseri hücre soylarının teminini sağlayan Prof. Dr. Seyhan ALTUN'a ve benden her türlü yardımlarını esirgemeyen Biyoloji bölüm hocalarıma,

Deney hazırlıkları ve deneylerin yapılması sırasındaki yardımları ve motivasyonu için çok değerli arkadaşım Hüda AYAN'a

Her zaman bana inanan, güvenen destek çıkan annem Fatma MÜJDECİ'ye, babam Metin MÜJDECİ'ye, ve canım kardeşim Burak MÜJDECİ'ye

Ayrıca, benim başarımı kendi başarısı olarak gören, destek ve yardımlarını benden esirgemeyen sevgili nişanlım Yunus Emre ÜRKÜT'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Normal hücre bölünmesi ve kanser hücresi bölünmesi. 3
Şekil 2.2. Prostat bezinin anatomik yapısı.....4
Şekil 2.3. Metastatik süreç.....9
Şekil 2.5. Voltaj kapılı sodyum kanalı modeli.....11
Şekil 2.7. İn vitro olarak yetiştirilen MAT-LyLu hücreleri.....13
Şekil 2.8. (A) Balon balığı, (B) Tetrodotoksinin kimyasal yapısı.....14
Şekil 2.9. Tiyosemikarbzonların kimyasal formülü.....15
Şekil 2.10.Tiyosemikarbazonların etki mekanizmaları 17
Şekil 3.1. Thiosemicarbazone'ların (TSC) genel sentez şeması: (R, R1, R2 = alkil veya aril grupları).....21
Şekil 3.1. Motilite indeksini belirlemek için kullanılan petrinin alt yüzüne yapılan çizim 24
Şekil 4.1.Toksisite grafiği: MAT-LyLu hücreleri üzerine 3,5 DTBSA-5-Me-TSC bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu elde edilen % canlılık oranları. 26
Şekil 4.2.MAT-LyLu hücreleri üzerine 3,5 DTBSA-5-Me-TSC maddesinin farklı konsantrasyonlarda uygulanmasıyla elde edilen normalize edilmiş hücre sayılarının konsantrasyona bağlı grafiği (±SH) 27
Şekil 4.3.MAT-LyLu hücreleri üzerine 3,5 DTBSA-5-Me-TSC maddesinin farklı konsantrasyonlarda uygulanmasıyla elde edilen inhibisyon oranları (±SH) 28
Şekil 4.4. MAT-LyLu hücreleri üzerine 3,5 DTBSA-5-Me-TSC bileşiğinin (A) 24 saat (B) 48 saat süreyle uygulanması sonucunda elde edilen mitoz indeksi (%) değerleri.....30
Şekil 4.8.MAT-LyLu hücreleri üzerine 3,5 DTBSA-5-Me-TSC maddesinin farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu elde edilen motilite indeksleri (MoI) 32

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 4.1. MAT-LyLu hücreleri üzerine farklı konsantrasyonlarda3,5 DTBSA-5-Me-TSC uygulaması sonucu elde edilen normalize edilen hücre sayıları ve inhibisyon oranları (%).....27
Çizelge 4.2. MAT-LyLu hücreleri üzerine 3,5 DTBSA-5-Me-TSC'nin farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu elde edilen mitoz indeksi (%) değerleri (±SH).....29
Çizelge 4.3.MAT-LyLu hücreleri üzerine 3,5 DTBSA-5-Me-TSC maddesinin farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu elde edilen motilite indeksi (±SH) değerleri ve kontrol grubuna oranla deney gruplarının motilite indekslerinde tespit edilen % değişim oranları. 32

SİMGELER DİZİNİ

3,5 DTBSA-5-Me-TSC	3, 5 - di - tert – butyl salicylaldehyde - S- methyl thiosemicarbazone
BPH	Benign Prostat Hiperplazisi
CBZ	Karbamazepin
DMSO	Dimetil sülfoksit
ECM	Ekstrasellüler matriks
MI	Mitotik İndeks
MoI	Motilite İndeksi
MTT	3 - (4,5-Dimetiltiazol-2yl) - 2,5 - Difenil tetrazolyum bromid yöntemi
PSA	Prostat Spesifik Antijen
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute-1640 medium
SC	Semikarbazon
TRUS	Trans Rektal Ultasonografi
TTX	Tetrodotoksin
TSC	Tiyosemikarbazon
VGIC	Voltaj Kapılı İyon Kanalı
VGSC	Voltaj Kapılı Sodyum Kanalı

1.GİRİŞ

Kanser hücresi kendi normal büyüme ve bölünme yeteneğini kaybetmiş yeni yüzey karekteri kazanmış bir yapıdır (Kumar ve ark., 2015). Ölümlere neden olan hastalıklar sıralamasında kanser, kardiyovasküler hastalıklardan sonra 2. sırada yer almaktadır (Haydaroğlu, 2007). Ülkemizde en çok görülen kanserler arasında ilk 5 sırayı erkeklerde akciğer, prostat, mesane, kolorektum ve mide kanseri alırken; kadınlarda bu sıralama meme, tiroid, kolorektum, mide, ve uterus kanseri şeklindedir (IARC, 2018).

İyon kanalları gözenek oluşturan membran protein kompleksidir ve bütün hücrelerde plazma ve organel zarlarında bulunmaktadır (Celesia, 2001). İyon kanalları elektrik iletiminde ve hücresel elektrogeneziste görev alır (Gautier, 2014). Ayrıca hücre membranı boyunca iyonların akışını düzenleyici rolleri vardır (Celesia, 2001). Kanser hücrelerinde de birbirinden farklı iyon kanalları bulunmuştur (Onkal ve Djamgoz, 2009). Hücrelerde çoğalma (hücre siklusu), hücre ölümü (apoptoz), homeostazın düzenlenmesi gibi birçok fizyolojik süreçten sorumlu olan iyon kanalları aynı zamanda migrasyon, invazyon ve anjiyogenez gibi pek çok metastatik davranışta da görev almaktadır (Kunzelmann, 2016). İyon kanalları; açılıp kapanması voltaj veya ligand gibi bir "kapı" ile kontrol edilen kanallar ile hücre iskeleti hareketlerine bağlı olarak açılan veya sürekli açık olan kanallar şeklinde sınıflandırılmaktadır. Kapı kontrollü kanallardan olan voltaj kapılı iyon kanalları (VGIC) içerisinde voltaj kapılı sodyum kanalları (VGSC), elektriksel olarak uyarılabilir hücrelerde aksiyon potansiyelinin oluşmasına neden olan transmembran proteinlerdir (Yu ve Catterall, 2003; Bernard ve ark., 2008).

Birçok kanserde tümörün oluşum ve gelişim aşamaları ile metastatik süreçte VGIC'ler görev almaktadır (Fiske ve ark., 2006). Spesifik bir VGSC blokeri olan tetrodotoksinin (TTX) kullanıldığı *in vitro* (Grimes ve ark., 1995) ve *in vivo* (Yıldırım ve ark., 2012) çalışmalarla artan metastatik aktivitenin VGSC'lerin aktivasyonunu yükselttiği (Diss ve ark., 2001; Djamgoz ve ark., 2001) ve artan

fonksiyonel VGSC ekspresyonunun kanser hücrelerini daha fazla agresifleştirdiği ortaya çıkarılmıştır (Djamgoz, 2014). Böylece VGSC'ler metastazların durdurulması için önemli bir potansiyel hedef haline gelmiştir.

Kanser tedavisi için çok çeşitli kemoterapötik maddeler kullanılmaktadır. Ancak kanserin bireye özgü bir hastalık olması nedeniyle tedavi amaçlı yeni ve özgün bileşikler oluşturulmalı ve bu bileşikler, olası antitümöral ve antimetastatik özellikler bakımından değerlendirilmelidir.

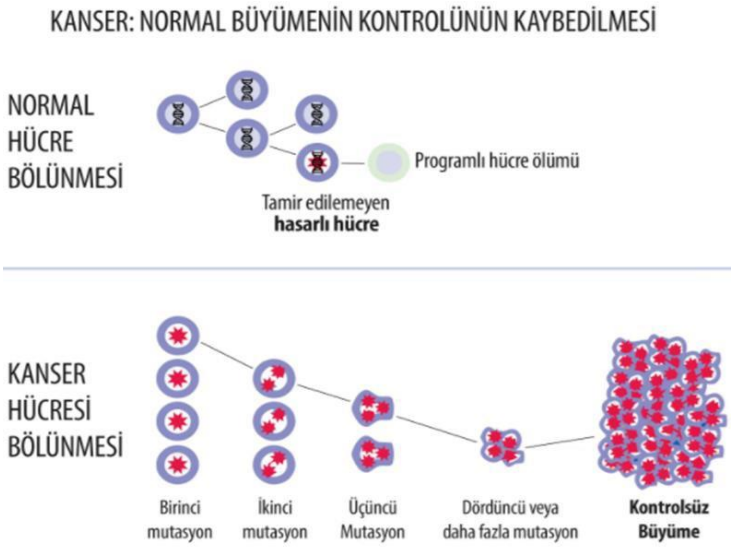
Tiyosemikarbazonlar (TSC), farmakolojik özellikleri nedeniyle oldukça ümit vadeden bileşiklerdir (Hernandez ve ark., 2008). TSC'ler anti-bakteriyel, anti-viral, antiparazitik, anti-tümöral gibi çeşitli aktiviteleriyle biyolojik ve kimyasal açıdan önemlidirler (Ferrari ve ark., 1999). Aynı zamanda TSC'lerin metal komplekslerinin biyolojik aktiviteleri üzerinde de çalışmalar yapılmaktadır. Pek çok çalışma ile bu bileşiklerin yapıları elektrokimyasal (Canadas ve ark., 2000) ve spektroskopik (Kovala-Demertzi 2001) yöntemlerle belirlenmiş ve biyolojik aktiviteye sahip oldukları gösterilmiştir (Joseph ve ark., 2004; Costa ve ark., 2005; Rebolledo, 2005).

Bu tez çalışmasında amacımız; Harran Üniversitesi Kimya Bölümü'nde yeni sentezlenmiş Tiyosemikarbozon türevi 3, 5 – di – tert – butyl salicylaldehyde – S – methyl thiosemicarbazone bileşiğinin, Dunning modeli sıçan prostat kanseri MAT-LyLu hücreleri üzerindeki biyolojik etkilerini hücre kinetiği (proliferasyon ve mitotik aktivite) ve hücre migrasyonu bakımlarından incelemektir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Kanser

Sergilediği yüksek insidans ile dünyada ve ülkemizde önemli bir sağlık problemi olan kanser, kalp hastalıklarından sonra ikinci sırada yer alan ölüm nedenidir (Tuncer, 2007). Kanser, çevresel ve genetik etmenlerin sonucu olarak ortaya çıkar. Görülme sıklığı ve türü; ırka, yaşa, cinsiyete göre değişim gösterir. Karsinogenez, normal bir hücrenin kontrolsüz şekilde bölünmesi ve hücresel denetim mekanizmalarından kaçması ile karakterizedir (Khanna ve Hunter, 2005). Çevresel etkenler gibi çeşitli nedenlerle hücrede biriken mutasyonlar ve hasarlı DNA'nın onarılamaması sonucunda kontrolsüz çoğalma başlar ve böylelikle primer tümörler meydana gelir (Şekil 2.1.). Hanahan ve Weinberg (2011), kökeni ve nedenleri farklı olmakla birlikte, kanser hücrelerinin on temel özelliği olduğunu bildirmişlerdir. Bunlar; sürekli proliferasyon sinyali, büyümeyi baskılayıcı faktörlerden kaçma, bağışıklık sisteminden kaçma, hücre ölümüne karşı direnme, invazyon ve metastazın aktivasyonu, yeni damar oluşumunun tetiklenmesi, genetik kararsızlık ve mutasyonlar, kanserleşmeyi destekleyen inflamasyon, sınırsız replikasyon potansiyeli ve enerji metabolizmasının değişmesidir (Hanahan ve Weinberg, 2011).



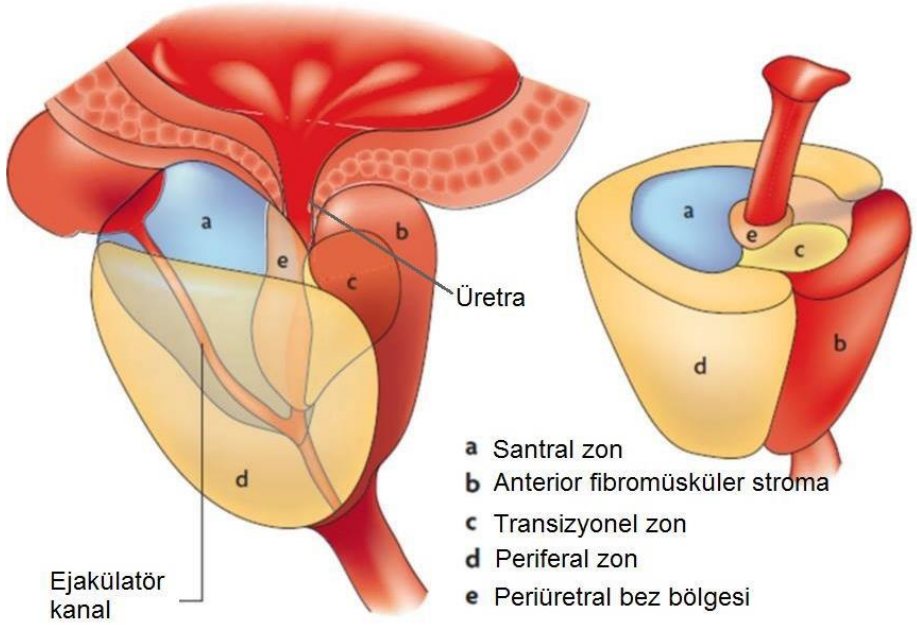
Şekil 2.1. Normal hücre bölünmesi ve kanser hücresi bölünmesi.

Kanserin belirtileri; hastalığın bulunduğu organa, vücuttaki yayılımına ya da kişiden kişiye farklılık göstermekle birlikte, başlıca belirtiler arasında vücudun bazı bölgelerinde meydana gelen değişiklikler, iyileşmeyen veya geç iyileşen yaralar, ben ve siğillerdeki değişiklikler, anormal kanama, yutma güçlüğü, geçmeyen öksürük ve ses kısıklığı, idrar ve dışkılama alışkanlıklarında değişiklikler, kilo kaybı, ateş, halsizlik, ağrı, deride gözlenen değişiklikler sayılabilir. Kanser uzun süreçte gelişen bir hastalık olup erken teşhis, tedavi şansını arttırmaktadır (Haydaroğlu, 2007).

2.2. Prostat Bezi

2.2.1. Prostat bezinin anatomisi

Prostat, erkek üreme sisteminin parçası olan bir salgı bezidir. Mesanenin altında, rektumun önünde yer alır. Erişkin bir erkekte ortalama olarak 3 x 4 x 2 cm (BxExD) boyutlarında ve yaklaşık 18-20 gram ağırlığındadır. Asıl işlevi meninin sıvı kısmını oluşturmak olan (Tanagho, 2004) prostat bezinin anatomik yapısı Şekil 2.2.'de verilmiştir.



Şekil 2.2. Prostat bezinin anatomik yapısı (De Marzo ve ark., 2007)

2.2.2. Prostat bezinin embriyolojisi

Prostat, uretranın mukoza ve kas tabakasından köken alır. Başlangıçta çok tabakalı epitelden ibaret olan prostat, testosteron hormonunun etkisi ile prenatal dönemin 10. haftasında gelişmeye başlar. Daha sonraları ergenlik döneminde çok tabakalı epitelin olgunlaşması ile kübik bazal hücreler ve iç kısmında salgılayıcı silindirik hücrelerden oluşan iki tabakalı epitele farklılaşır (Scardino ve Kelman, 2005).

2.2.3. Prostat bezinin fizyolojisi

Prostat bezi, yapısında sitrat, çinko, kalsiyum gibi birçok elementin yanısıra bazı proteazlar içeren, ince, sütsü, alkalen bir sıvı salgılar. Prostat sıvısının bileşenlerinin işlevlerine dair bazı bulgular vardır. Örneğin prostat sıvısının bileşiminde bulunan çinko bakteriyostatik özellikte iken sitrat osmotik dengenin sağlanmasında görev alır. Prostatik spesifik antijen (PSA) prostatik epitelyumdan salgılanır. PSA, hem tripsin hem de kimotripsin benzeri enzimatik etkiye sahiptir. Günümüzde prostat kanseri tanısını koymada, tedavisinde ve takibinde kullanılan önemli bir belirteçtir. Prostatik asit fosfatazın (PAF) semendeki görevi bilinmemektedir. Ancak, metastatik prostat kanseri hücreleri bu enzimi kana salgılar ve bu yönüyle klinik önem taşır. (Mehik, 2001).

2.2.4. Prostat bezinin histolojisi

Erişkinde normal prostat bezi, fibromuskuler bir stroma içinde ortalama olarak 30-50 adet tubuloalveoler glandın bulunduğu bir organdır. Yapı olarak stroma, fibröz ve muskuler dokulardan oluşmuştur. Prostat bezinde üç grup hücre; sekretuvar hücreler, bazal hücreler, nöroendokrin hücreler bulunmaktadır. ***Sekretuvar hücreler***; epitelyal hücrelerin en önemli kısmını oluşturur ve prostatik asit fosfataz (PAF) ile prostat spesifik antijeni (PSA) sentezlerler. Aynı zamanda bu hücreler androjen reseptörü içerir. Prostatik sekresyon nötral mukosubstantlardan oluşur (Miki ve Rhim, 2008). Bir diğer hücre tipi olan ***bazal hücreler***, bazal membran üzerinde

bulunur. Bazal hücrelerin, sekretuvar hücreler ile skuamöz, değişici ve musinöz epitele dönüşme özellikleri vardır. Aynı zamanda lokal regulatör maddelerin salgılanmasından sorumlu oldukları düşünülmektedir. Prostat bezinde az sayıda bulunan üçüncü hücre tipi olan ***nöroendokrin hücreler***, kromogranin A ve B, sekretogranin II, somatostatin, kalsitonin ve bombesin salgılarlar. Nöroendokrin hücreler, ileri derecede farklılaşmış, post-mitotik ve androjen-duyarsız hücrelerdir (Collins ve Maitland, 2006).

Prostat bezinde iki çeşit büyüme görülmektdir. Bunlardan birincisi iyi huylu olup ileri yaşlardaki erkeklerde rastlanan benign prostat hiperplazisi (BPH)'dir. BPH, genellikle bezin üretrayı çevreleyen geçiş zonunda meydana gelirken çoğalan hücreler, ilerlemiş evrede bile bez içinde lokalize olarak kalır; çevre dokulara yayılım göstermezler. Burada genişleyen kitle üretraya baskı yaptığı için idrar yapmakta zorluk, sık idrara çıkma ihtiyacı, mesanenin tam boşaltılamaması gibi belirtilere neden olur. İkinci büyüme şekli olan malign tip prostat büyümesi sonunda prostat kanseri meydana gelmektedir. Prostat kanseri, yüksek oranda bezin periferal zonunda gelişmekte ve ileri evrelerinde vücudun diğer bölgelerine yayılım gösterebilmektedir. Prostat kanserinde de BPH ile benzer şikayetler görülür. Fakat BPH, prostat kanserine dönüşmez (Scardino ve Kelman, 2005).

2.3. Prostat Kanseri

Erkeklerde ikinci en sık görülen kanser türü olan prostat kanseri, ülkemizde kansere bağlı ölümlerin yine ikinci sırada yer alan nedenidir (IARC, 2018).

Prostat kanserinin nedenleri genetik veya çevresel faktörler (yaş, ırk, androjen hormonları, diyet, vb.) olmak üzere iki temel grupta toplanabilir. 50 yaş altındaki erkeklerde prostat kanseri görülme olasılığı düşükken 65 yaş üzerinde %80 civarındadır. 90 yaşlarından sonra ise hemen hemen bütün erkeklerin prostat dokularında kanser odakları görülmektedir (Dizdar, 2003). Prostat kanseri insidansı bakımından ülkeler arasında değişiklikler göze çarpmaktadır. Çin, Hindistan, Japonya, Azerbaycan gibi Asya ülkelerinde prostat kanseri insidansı oldukça

düşüktür; ancak Afrika kökenli Amerikalılar'da hastalığın görülme olasılığı yüksektir (Patel ve Klein, 2009). Bu farklılık, genetik yapının yanısıra beslenme şekilleri veya teşhis yöntemlerindeki farklılıklardan da kaynaklanabilmektedir. (Bostwick ve ark., 2004). Ailede prostat kanseri hastalığının bulunması risk faktörleri içinde kabul edilmektedir ve hastalıktan etkilenen akrabanın yakınlık derecesine bağlı olarak insidans yükselmektedir (Patel ve Klein, 2009). Aynı zamanda beslenme de önemli bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır. Japonya'da yaşayan Japon halkında prostat kanseri görülme oranı düşük iken, Kuzey Amerika'ya göç eden Japonlar'da bu oranın arttığı görülmektedir (Shimizu ve ark., 1991). Bunun sebebinin, Japonya'da soya proteini bakımından zengin olan besinlerin hayvansal yağ içerikli besinlerden daha fazla tüketilmesi olabileceği ifade edilmiştir (Shimizu ve ark., 1991). Bazı besinlerin kanseri tetiklediği; kalsiyum, vitamin E, soya, selenyum ve çoklu doymamış yağ asitleri içeren yiyecekler, likopen türü flavonoidler ve yeşil çayın ise kanser hücrelerini baskıladığı bildirilmiştir (Denis ve ark., 1999; Schorah, 1999).

Erken yaşta ortaya çıkan prostat kanserlerinin ailesel geçişli olduğu düşünülmektedir. Kalıtsal prostat kanserinde *HPCX*, *CAPB*, *HPC20*, *HPC1*, *PCaP*, *HPC2*/*ELAC2* gibi bazı genlerin görev aldığı bilinmektedir (Simard ve ark., 2003). Bunun yanı sıra steroid hormon reseptör sinyal yolları prostat gelişiminin her evresinde rol oynamaktadır. Androjen hormonlar, fizyolojik olarak prostatın büyümesi, gelişmesi ve fonksiyonu için gereklidir. Erkeklerde androjen/östrojen oranı yaşa bağlı olarak azalırken prostat kanserinin ortaya çıkışında önemli bir faktör olduğu düşünülmektedir (Abate-Shen ve Shen, 2002). Prostat kanserinin ortaya çıkışından sorumlu mekanizmalar arasında çeşitli sinyal iletim yolları, anjiyogenez, proliferasyon, hücre ölümü, adezyon, farklılaşma, migrasyon ve DNA tamiri gibi önemli hücre fonksiyonlarının düzensizlikleri sayılabilir (Bostwick ve Chang, 1999).

Erken teşhis, bütün kanser türlerinde olduğu gibi prostat kanserinde de önem taşımaktadır. Fakat prostat kanserinin erken dönemlerinde belirti görülmezken ilerleyen dönemlerinde prostat bezinin büyümesinden dolayı idrar yapmakta zorlanma, idrarda veya semende kan görülmesi, ağrı ve erektil fonksiyon kaybı gibi belirtiler ortaya çıkabilmektedir. Parmakla rektal inceleme, prostat spesifik antijen

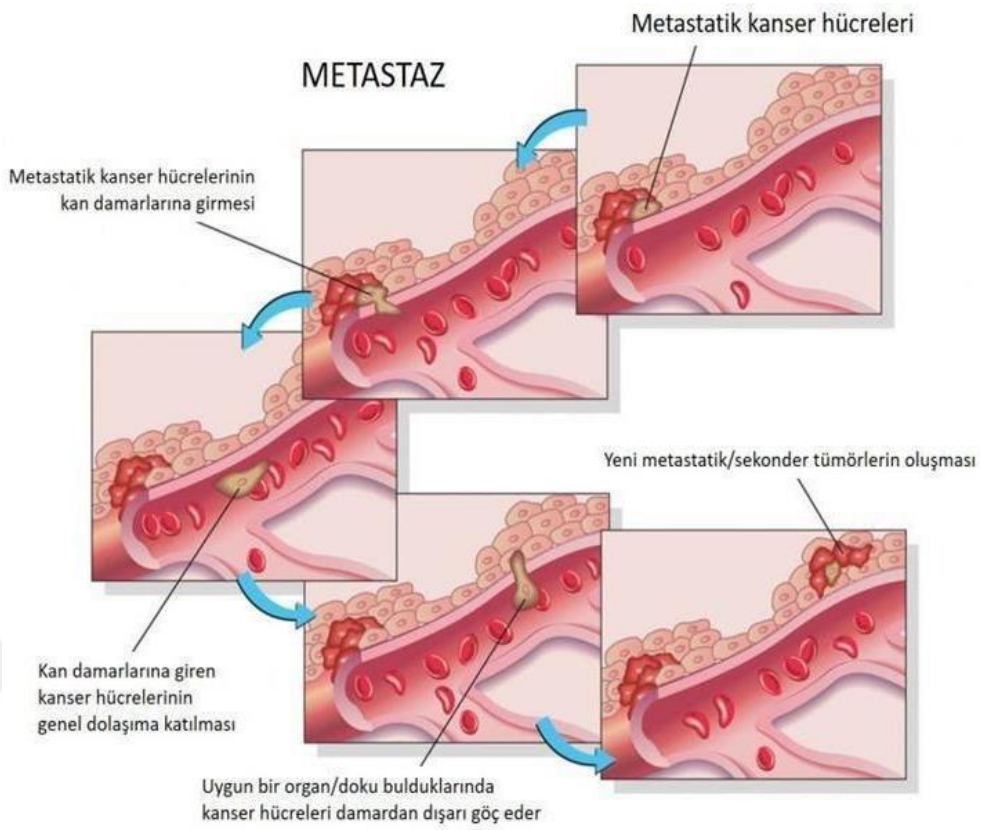
(PSA), transrektal ultrasonografi (TRUS) ve biyopsi yöntemleri sayesinde prostat kanseri tanısı konulmaktadır. Prostat kanserinin tedavisinde ise radyoterapi, cerrahi ve hormon tedavisi yöntemleri kullanılmaktadır. Hastalığın bez ile sınırlı olduğu dönemde cerrahi ve radyoterapi; metastatik dönemde hormonal tedavi yöntemleri uygulanmaktadır (Erözenci, 2003). Prostat kanserinin metastatik evresinde prostat tümörleri, akciğere, kemiklere, ve lenf nodlarına yayılım gösterir. Metastazın başladığı dönemlerde uygulanan hormonal tedavi, androjen hormonlarının sentezinin ya da reseptörlerinin inhibe edilmesini sağlar. Bu tedavi başlangıçta hastalığı kontrol altına alırken ilerleyen zamanlarda (ortalama iki yıl sonra) hormona karşı direnç gelişir ve tedaviye yanıt ortadan kalkar (Hellerstedt ve Pienta, 2002; Kageyama ve ark., 2007).

2.4. Prostat Kanserinde Metastaz, Migrasyon ve İyon Kanalları

2.4.1. Metastaz ve migrasyon

Kanser vakalarında ölüm primer tümörden ziyade metastazlardan kaynaklanmaktadır. Metastaz, primer tümör kitlesindeki hareket yeteneği kazanmış bir hücrenin kan ve / veya lenf damarları aracılığıyla dolaşıma katılıp uygun bir doku veya organda dışarı çıkarak bu bölgelerde ikincil tümörleri oluşturmasıdır (Şekil 2.3.) (Madeja ve ark., 2005; Tapon ve Ziebold, 2008).

Tümör hücresinin genetik yapısı her tümör için farklılık gösterir; fakat metastatik süreç bütün tümörlerde benzerdir. Metastatik yayılımın en önemli aşaması tümör hücrelerinin hareket özelliği (motilite / migrasyon) kazanmasıdır. Hücrenin hareketi, ekstrasellüler matriks (ECM) ve hücre iskeleti arasında aktif şekilde ilerleyen karmaşık bir süreçtir. Tümör hücreleri ECM bileşenleri ile adezyon moleküllerine tutunur ve orada birtakım enzimler salarak veya dokunun enzim salmasını uyararak ECM içine hareket eder (Woodhouse ve ark.,1997).



Şekil 2.3. Metastatik süreç

Dunning R3327 sıçan prostat adenokarsinoma hücre hatlarıyla (AT1, AT2, AT3, Mat-Lu, MAT-LyLu) yapılan çalışmalar, tümör hücresinin motilitesi ile metastaz arasındaki ilişkinin gösterilmesine yardımcı olmuştur. Prostat tümör hücreleri; ECM bileşenleri dışında endotel hücreleri, düz kas hücreleri, stromal hücreler ile bazal, sekretuvar ve nöroendokrin olarak özelleşmiş epitelyum hücrelerinin bulunduğu karmaşık yapıya sahiptir. Bu hücre tipleri, çoğalma, farklılaşma ve migrasyon gibi hücresel davranışların düzenlenmesinde görev almaktadır (Banyard ve Zetter, 1999). Prostat tümör hücrelerinden salınan epidermal büyüme faktörünün (EGF) ve bunun reseptörlerinin, transforme edici büyüme faktörünün (TGF β), otokrin motilite faktörünün (AMF) artan ekspresyonları, farklı prostat kanseri hücre soylarında metastazı ve migrasyonu arttırmıştır (Hobeika ve ark., 1999). Prostat kanserinin çoğunlukla kemik, akciğer, karaciğer ve plevraya metastaz yaptığı bildirilmiştir (Bubendorf ve ark., 2000). Bunun nedeninin büyüme faktörleri ile büyüme faktörü reseptörlerinin farklı şekilde eksprese edilmesi olabileceği düşünülmektedir (Ritchie ve ark.,1997; Figueroa ve ark.,1998).

2.4.2. İyon kanalları

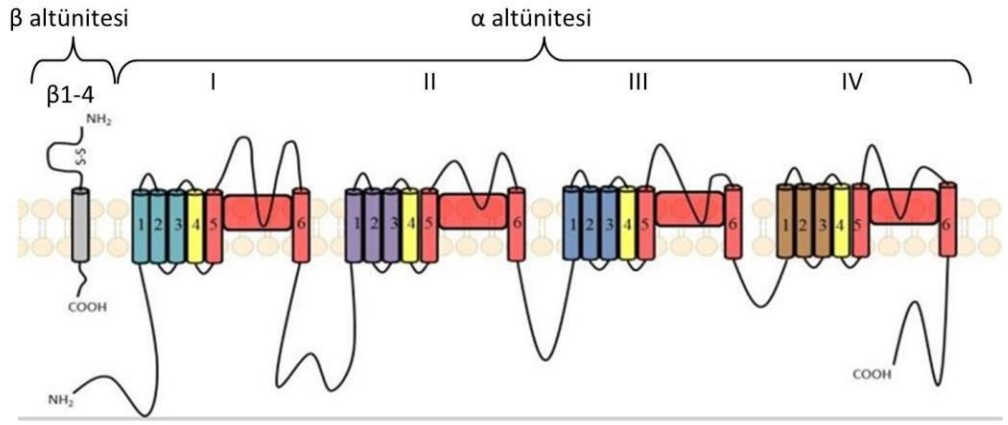
İyon kanalları, hücre zarında gözenek oluşturan, iyonlara karşı seçici özellik gösteren transmembran proteinlerdir (Hille, 2001). İyon kanalları sayesinde iyonların hücre içine ve dışına taşınması gerçekleşir. Birçok canlının hücre zarında bulunan iyon kanalları, hormonların salgılanması, duyuların algılanması, sinir uyarılarının iletilmesi, kas hücrelerinin kasılması (Ashcroft, 2006) ve homeostazın sağlanmasının (Ashcroft, 2006; Jean-Yves ve diğ., 2007) yanı sıra hücre motilitesi ve invazyonunda da rol oynamaktadır. Fakat iyon kanallarının kanserin hangi aşamasında sürece dahil olduğu kesin olarak bilinmemektedir (Kunzelmann, 2005).

Aksiyon potansiyelinin oluşumunda ve iletilmesinde görev alan voltaj kapılı iyon kanalları (Hille, 2001), Na^+, Ca^{2+} ve K^+ kanallarından oluşan geniş protein ailesidir (Terlau ve Stühmer, 1998). Sağlıklı bir hücrenin kanser hücresine dönüşümünde, iyon kanallarının çalışmasını ve yapısını etkileyecek düzeyde genetik değişimler meydana gelebilir ve bunun sonucunda iyon kanallarının anormal şekilde çalışması tümör proliferasyonunu güçlendirebilir (Kunzelmann, 2005). Son yıllarda yapılan çalışmalarda hastalığın kötüye gitmesinde voltaj kapılı iyon kanallarının rolü olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle spesifik hedef noktaları olarak ele alınabilecek iyon kanalları kansere yönelik tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde önem taşımaktadır (Fiske ve ark., 2006). Prostat, meme, kolon gibi birçok kanser türlerinde proliferasyon ve metastatik sürecin ilerleyişinde voltaj kapılı iyon kanallarının görev aldığı çalışmalarla gösterilmiştir (Laniado ve ark., 1997; Anderson ve ark., 2003; Preussat ve ark., 2003; Fraser ve ark., 2005; Fiske ve ark., 2006).

2.4.2.1. Voltaj kapılı sodyum kanalları

Voltaj kapılı sodyum kanalı (VGSC), hayvan hücrelerinde, aksiyon potansiyelinin depolarizasyon fazının ilk sorumlusu olarak, elektriksel uyarılabilirliğini kontrol eden kanaldır (Goldin, 2003). VGSC'ler, 220-260 kDa ağırlığında bir α alt ünitesi ve yaklaşık 33-36 kDa ağırlığında bir veya daha fazla yardımcı β alt ünitesinden meydana gelen heteromerik bir komplekstir (Şekil 2.4.)

(Catterall ve ark., 2007). Yapılan araştırmalar, VGSC'leri kodlayan genlerdeki mutasyonlar sonucunda, kanalın fonksiyonunda meydana gelen değişimlerle bir takım hastalıkların ortaya çıktığını ve ayrıca VGSC'lerin, endotel hücreleri (Gordienko ve Tsukahara, 1994; Walsh ve ark., 1998; Nilius ve Droogmans, 2001), lenfosit (Fraser ve ark., 2004) ve glia (Sontheimer ve ark., 1996) gibi uyarılabilir olmayan hücrelerle kanser hücrelerinde ekspresse edildiğini göstermiştir (Onkal ve Djamgoz, 2009). Kanser hücre soylarıyla yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda prostat (Diss ve ark., 2001; Diss ve ark., 2005; Nakajima ve ark., 2009), küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (Roger ve ark., 2007), küçük hücreli akciğer kanseri (Blandino ve ark., 1995; Onganer ve Djamgoz 2005), meme (Roger ve ark., 2003; Brackenbury ve ark., 2007; Gao ve ark., 2009), melanoma (Allen ve ark., 1997), glioma (Schrey ve ark., 2002), serviks (Hernandez-Plata ve ak., 2011), mezotelyoma (Fulgenzi ve ark., 2006), kolon kanseri (House ve ark., 2010) ve ovaryumda (Gao ve ark., 2010) artmış VGSC ekspresyonu tespit edilmiştir.



Şekil 2.5. Voltaj kapılı sodyum kanalı modeli (Waszkielewicz ve ark., 2013'ten değiştirilerek).

In vitro araştırmaların sonucunda metastazın, VGSC fonksiyonu ile bağlantılı olduğu ortaya çıkarılmıştır. Metastatik hücre morfolojisinin kazanılması (Fraser ve ark., 1999), yapışma yüzeyinden ayrılma (Palmer ve ark., 2008; Fraser ve ark., 2010), ekzositoz/endositoz aktivitesi (Fraser ve ark., 2005; Onganer ve Djamgoz, 2007; Krasowska ve ark., 2009), galvanotaktik hareket (Djamgoz ve ark., 2001; Fraser ve ark., 2005), invazyon (Pan ve Djamgoz, 2008; Gao ve ark., 2009; Gillet ve ark., 2009; Nakajima ve ark., 2009; Gao ve ark., 2010; House ve ark., 2010;

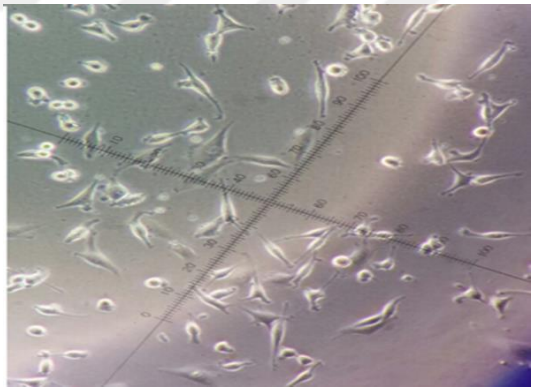
Hernandez-Plata ve ark., 2011), lateral hücre hareketi (migrasyon) (Pan ve Djamgoz, 2008; Gao ve ark., 2009; Gao ve ark., 2010) bazı metastatik hücre davranışlarıdır. VGSC aktivitesinin, farmakolojik (spesifik VGSC blokeri olan TTX ile) veya genomik (gen susturma) yöntemlerle inhibe edilmesinin, metastatik hücre davranışlarını azalttığı gösterilmiştir. Dolayısıyla kanalın fonksiyonu inhibe edildiğinde, metastatik aktivite de inhibe olmaktadır (Roger ve ark., 2007; Gao ve ark., 2009; Nakajima ve ark., 2009; Gao ve ark., 2010; House ve ark., 2010; Hernandez-Plata ve ark., 2011).

Başlangıçta, sıçan prostat kanser hücre soyları ile yapılan elektrofizyolojik ve *in vitro* çalışmalarda VGSC'lerin prostat kanserinin metastatik aktivitesinde görevinin olduğuna dair bilgiler elde edilmiştir. Dunning prostat kanser modeli AT-2 ve MAT-LyLu hücre soyları ile yapılan bir çalışmada güçlü metastatik özelliğe sahip MAT-LyLu hücrelerinde VGSC akımı TTX ile bloklandığında hücrelerin invazyon yeteneklerinin azaldığı görülmüştür. Bunun aksine, AT-2 hücresine yapılan benzer uygulama sonucunda hücrelerin invazyon yeteneği üzerinde herhangi bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Böylelikle VGSC ekspresyonu ile metastatik aktivite arasında ilk bağlantılar kurulmuştur. (Grimes ve ark., 1995). AT-2, MAT-LyLu, LNCaP ve PC-3 gibi çeşitli prostat kanser hücrelerinde VGSC'lerin alt ünitesini kodlayan 7 farklı genin (*SCN1A–SCN4A*, *SCN7A*, *SCN9A* ve *SCN11A*) ekspresyonunun bulunduğu mRNA düzeyinde tespit edilmiştir (Diss ve ark., 2001). Bu 7 farklı genin ürünü olan mRNA moleküllerinin ekspresyon seviyesinin güçlü metastatik hücrelerde zayıf metastatik hücrelere göre daha fazla olduğu belirlenmiştir. Özellikle, *SCN9A* geninin ekspresyonunun güçlü metastatik MAT-LyLu ve PC-3 hücrelerinde, zayıf metastatik AT-2 ve LNCaP'a göre oldukça yüksek olduğu, aynı zamanda bu hücrelerde elektrofizyolojik olarak ölçülen VGSC akımının *SCN9A*'nın ürünü olan Nav1.7 alt tipinden kaynaklandığı gösterilmiştir (Diss ve diğ., 2001). Bulgular, Yıldırım ve ark. (2012) tarafından *in vivo* olarak da kanıtlanmıştır. Ayrıca, prostat kanseri hastalarından alınan tümör örneklerinin immünohistokimyasal incelemelerinde, tümör dokusunda VGSC protein ekspresyonu gösterilmiştir (Abdul ve Hoosein, 2002; Diss ve ark., 2005).

2.5. Dunning Modeli Sıçan Prostat Kanseri Hücreleri: MAT-LyLu

MAT-LyLu hücreleri *in vivo* özelliklerini kaybetmeden *in vitro* kültür ortamında da yaşatılabilmektedir (Şekil 2.7.). Mikroskobik incelemelerde nukleus kolayca ayırt edilebilmekte; büyük, ince, uzun oluşları ve çok yüzlü morfolojileriyle dikkat çekmektedirler. Bu hücreler, *in vivo* olarak sıçanlara enjekte edildiğinde akciğer ve lenf düğümlerinde %100 metastaz oluşturmaktadırlar (Wenger ve ark., 1984)

Patch-clamp tekniği kullanarak yapılan *in vitro* çalışmalarda, güçlü metastatik özelliğe sahip MAT-LyLu hücrelerinin metastatik özellikleri ile VGSC'ler arasında ilişki olduğu belirlenmiş ve MAT-LyLu hücrelerinde VGSC akımı bulunmuştur (Grimes ve ark., 1995). VGSC blokeri olan TTX, 600 nM konsantrasyonda hücrelere uygulanmış ve hücrelerin invazyonunu %33 oranında baskıladığı tespit edilmiştir. Daha sonra yapılan başka bir çalışmada MAT-LyLu hücrelerindeki VGSC'lerin TTX'e duyarlı tipte (TTX-S) olduğu gözlemlenmiştir (Grimes ve Djamgoz 1998).



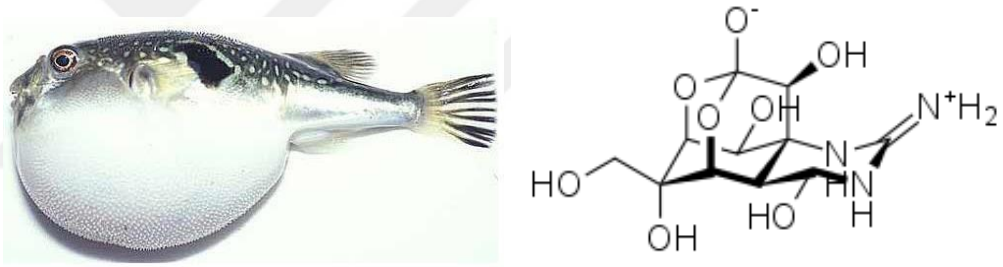
Şekil 2.7. İn vitro olarak yetiştirilen MAT-LyLu hücreleri (büyütme oranı: 20x).

2.6. Tetrodotoksin (TTX)

Tetraodontidae familyasına ait balon balıklarının bütün türlerinde tetrodotoksin (TTX) adında zehirli bir madde bulunmaktadır (Şekil 2.8.). Deniz canlılarının yanısıra kalın derili kertenkele, artropodlar, nematodlar, yumuşakçalar gibi bazı karasal hayvanlarda da görülmektedir (Narahashi, 2008). Balon balıklarının toksin

miktarı bölgesel olarak farklılıklar göstermekte; ülkemizde bulunanların zehir oranı Japonya'da bulunan balıkların zehir oranından daha az olduğu bilinmektedir. Balık, zehirli maddesini üreme ve savunma amaçlı kullanmaktadır (Noguchi ve ark., 2006; Williams, 2010). TTX, insan vücudu ile fazla miktarda teması halinde veya yutulması durumunda ölüme sebebiyet vermektedir (Hanifin, 2010). TTX'in kimyasal yapısı ısıya dirençlidir ve pişirmeyle yapısı bozulmaz (Kao, 1972; Noguchi ve Ebesu, 2001; Hwang ve Noguchi, 2007; Chua ve Chew, 2009).

Spesifik bir sodyum kanal blokeri olması sebebiyle VGSC'lerin çeşitli hücresel süreçlerdeki rollerinin araştırılmasında ve pozitif kontrol olarak çeşitli çalışmalarda kullanılan TTX, protein yapıda olmayan kuvvetli bir nörotoksindir (Wu ve ark., 2005). TTX'in kimyasal formülü $C_{11}H_{17}N_3O_8$'dir (Ma: 319.27 g/mol; CAS numarası: 4368-28-9) (Miyazawa ve Noguchi, 2001; Hwang ve Noguchi, 2007).



(A) (B)

Şekil 2.8. (A) Balon balığı (Anonim, 2018), (B) Tetrodotoksinin kimyasal yapısı (Alomone Labs, 2018).

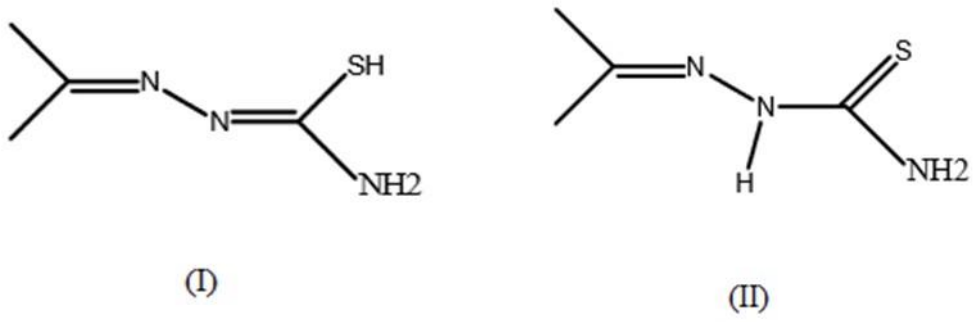
TTX, VGSC'lerin üzerinde hücre zarının dış tarafında bulunan reseptör bölgesine bağlanarak sodyum iletimini bloke eder. Reseptör bölgesi, her dört domaindeki S6 segmentinin N-terminal tarafındaki SS2 segmentinde lokalize olmuş iki adet aminoasit halkasından oluşur (Cestele ve Catterall, 2000). Genel olarak VGSC'ler TTX duyarlılığına göre ikiye ayrılır: TTX'e hassas (TTX-S) kanallar nanomolar konsantrasyonda TTX ile bloke olurken TTX'e dirençli (TTX-R) kanallar ise mikromolar konsantrasyonda TTX'e duyarlıdır (Fozzard ve Lipkind, 2010). MAT-LyLu hücrelerindeki VGSC'lerin TTX-S oldukları görülmüştür (Grimes ve Djamgoz, 1998). Farmakolojik ajanlarla yapılan çalışmalarla Nav1.1, Nav1.4,

Nav1.6 ve Nav1.7 tiplerindeki VGSC α alt ünitelerinin TTX-S diğerlerinin (Nav1.5, Nav1.8, ve Nav1.9) ise TTX-R olduğu gösterilmiştir (Diss ve ark., 2004).

TTX ağrı giderici özelliğe sahiptir ve morfin ve benzeri maddelerde olduğu gibi aşırı yatıştırıcı yan etki göstermez (Marcil ve ark., 2006). Sıçanlar üzerinde yapılan bir araştırmada omurilik yaralanmalarına lokal olarak TTX uygulandığında omurilikteki ak madde kaybının azaldığı ve iyileşmeye katkıda bulunduğu gözlemlenmiştir (Teng ve Wrathal, 1997).

2.7. Tiyosemikarbazonlar

Tiyosemikarbazonlar (TSC), farmakolojik aktiviteleri sebebiyle *in vivo* ve *in vitro* ortamlarda çok kapsamlı bir şekilde araştırması yapılabilen ayrıca hem biyolojide hemde kimyada oldukça ümit vadeden bileşiklerdir. Tiyosemikarbazonlar, aldehit ve ketonun yoğunlaşma reaksiyonu yoluyla tiyosemikarbazid ile reaksiyona girdiği zaman oluşan bir imin türevidir. Kükürt ve azot gibi karşı atomlar tiyosemikarbazon türevlerini aktif hale getirir (Sharma ve Pathak, 2016). Tiyosemikarbazonlar çözelti halindeyken tiyol formunda (I) veya katı halinde tiyon (kükürtlü) (II) olarak bulunabilmektedir (Şekil 2.9.) (Pal ve ark., 2002).

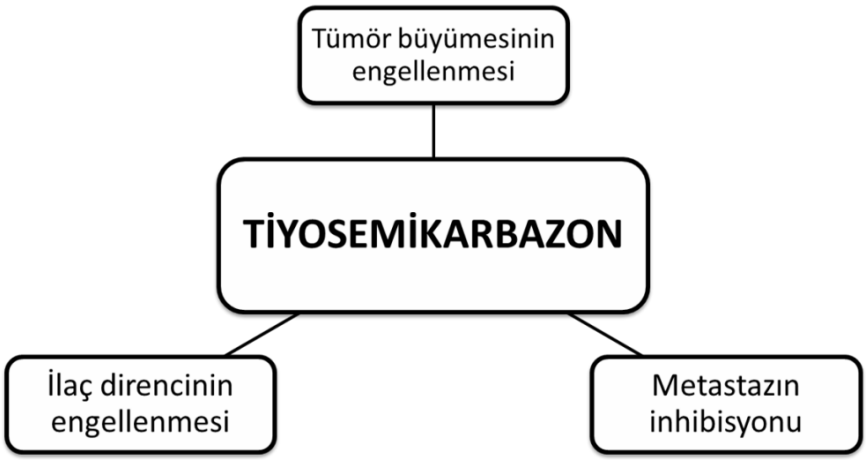


Şekil 2.9. Tiyosemikarbzonların kimyasal formülü

Tiyosemikarbozonların birçok biyolojik aktivite sergiledikleri görülmüştür: Antimikrobiyal (Kulandaivelu ve ark., 2011), antiviral (Banerjee ve ark., 2011) antifungal (Kulandaivelu ve ark., 2011) ve antiparazitik (Britta ve ark., 2012; Britta ve ark., 2015) aktivitelerinin yanısıra sahip oldukları antitümöral (Hernandez ve ark.,

2008; Kulandaivelu ve ark., 2011; Beytur ve ark., 2011) ve potansiyel antimetastatik aktiviteleri (Kumar ve ark., 2010; Kovacevic ve Richardson, 2012) sayesinde ilaç sanayisinde geniş kullanım alanı bulmaktadırlar (Silva ve ark., 1998). Günümüze dek yapılan birçok çalışmada antitümör özellik gösterdikleri tespit edilmiştir. 2-formylpyridine thiosemicarbazon adlı bileşiğin toksik etki gösterdiği, aynı zamanda antilökemik etkiye de sahip olduğu görülmüştür (Brockman ve ark., 1956). İlerleyen zamanlarda bu bileşiğin daha az toksik etki gösteren türevleri sentezlenmiş ve yeni bileşik/ler L-1210 ve LLC gibi bazı kanser hücrelerine karşı etki göstermiştir (French ve ark., 1966). Başka bir TSC türevinin [α(N)-heterocyclic carboxaldehyde thisemicarbazone] Sarcoma-180 hücrelerinde DNA replikasyonunu kuvvetli oranda inhibe ettiği görülmüştür (Sartorelli ve ark., 1971). Bir başka grup araştırmacı tiyosemikarbazonların bakır (Cu) veya demir (Fe) komplekslerinin Ehrlich asit tümörne (EAT) karşı sitotoksik etki gösterdiğini bulmuşlardır (Antholine ve ark., 1976). 5-formyluracil thiosemicarbazone'un Cu(II) kompleksinin insan lösemi hücre soyları K562 ve CEM hücrelerinin çoğalmasını durdurduğu ve apoptozu indüklediği tespit edilmiştir (Ferrari ve ark., 1998). Başka bir tiyosemikarbazon türevinin palladyum ve platinum komplekslerinin lösemi P388 hücrelerine karşı etkili olduğu (Kovala-Demertzi ve ark., 1998), L1210 ve P388 hücrelerinde DNA sentezini inhibe ettiği gösterilmiştir (Kovala-Demertzi ve ark., 1997). Hernandez ve ark., (2008) benzaldehyde tiyosemikarbazon türevlerinin palladyum ve platinum komplekslerinin H460, ME180, M-14,DU145, MCF-7, HT-29, PC-3 ve K562 hücre soylarına karşı sitotoksik etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

Araştırmalar, kanser kemoterapisinde kullanılabilecek tiyosemikarbazon bileşiklerinin, etkilerini; tümör büyümesinin engellenmesi, ilaç direncinin engellenmesi ve metastazın inhibisyonu olmak üzere üç mekanizma ile gerçekleştirdiğini ortaya çıkarmıştır (Şekil 2.10.) (Jansson ve ark., 2015a).



Şekil 2.10. Tiyosemikarbazonların etki mekanizmaları (Jansson ve ark., 2015a)

2.7.1. Tümör büyümesinin engellenmesi

Günümüze dek yapılan çalışmalarla, tiyosemikarbazonların antitümör aktivitelerinin çeşitli mekanizmaları gösterilmiştir. Chen ve ark. (2004), DNA sentezi için gerekli olan topoizomeraz IIa ve ribonükleotid redüktaz enzimlerinin 1,2-naphthoquinone thiosemicarbazone bileşiği ile onun metal komplekslerinin iki ana hedefi olduğunu göstermişlerdir. Başka bir araştırmada, alpha-(N)-heterocyclic carboxaldehyde thiosemicarbazone türevlerinin ümit verici bir ribonükleotid redüktaz inhibitörü oldukları bildirilmiştir (Li ve ark., 2001). Tiyosemikarbazonlar demir şelatlayıcılar olarak bilinirler ve demir şelatları redoks aktiftir. Bu nedenle heme-demir stabilize edilmemiş tirozin serbest radikalini istikrarsızlaştırabilir veya tahrip edebilir. Böylece RR'nin katalitik fonksiyonunu inhibe edebilir. (Leonard ve ark., 2003; Higgins, 2007).

2.7.2. İlaç direncinin engellenmesi

Son yıllarda yapılan çalışmalarla tiyosemikarbazonların ilaç direncini engelleyebildikleri tespit dilmiştir. Bir çalışmada, P-glikoprotein (P-gp) ekspresyonunun ve fonksiyonunun plazma membranı ile sınırlı olmadığı, aynı zamanda lizozomlarda hücre içi varlığını işaretlediği de gösterilmiştir. Diğer ilaç moleküllerinin aksine, lizozomal P-gp, tiyosemikarbazonların lizozomlara taşınmasını arttırmıştır Bu durum, P-gp eksprese eden tümör hücrelerine karşı artan

lizozomal hasarı ve tiyosemikarbazonların sitotoksisitesini açıklamaktadır (Jansson ve ark., 2015b).

2.7.3. Metastazın inhibisyonu

Metastaz, kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir (Tapon ve Ziebold, 2008). NDRG1 bir metastaz baskılayıcı proteindir (Maruyama ve ark., 2006). Primer tümör büyümesini, anjiyogenezi ve metastazı inhibe eder (Sun ve ark., 2013; Bae ve ark., 2013). Tiyosemikarbozonların, demirin tümör hücreleri tarafından tüketilmesiyle oluşan hipoksi durumunda NDRG1 proteinini up regüle ettiği (arttırma yönünde düzenleme) bulunmuştur (Bandyopadhyay ve ark., 2003; Le ve Richardson, 2004).

Ayrıca son yıllarda voltaj kapılı iyon kanallarının kanser progresyonu ve metastaz gelişimdeki rollerinin keşfedilmesiyle bu kanalların tedavi hedefi olarak kullanımları değerlendirilmektedir. Tiyosemikarbazonlarla benzer evrimsel gruplara sahip karbamazepin, okskarbazepin gibi antiepileptikler, VGSC'leri inhibe etmektedirler (Ambrosio ve ark., 2002). VGSC'lerin bloklanması ile metastatik ilerlemenin durdurulabileceği (Djamgoz, 2014) fikrinden hareketle Tiyosemikarbazon türevi bileşikler antimetastatik ajan olarak da kullanım potansiyeli sunmaktadırlar.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

- Sınıf II güvenlik kabini (Thermo, USA)
- CO2'li inkübatör (Eppendorf, Almanya)
- İnverted ışık mikroskobu (Olympus, Japonya)
- Su banyosu (Isolab, Almanya)
- Eliza mikroplaka okuyucu (Biochrom, İngiltere)
- Santrifüj (Nüve, Türkiye)
- 100x20 mm'lik kültür kapları (Greiner, Almanya)
- 35x20 mm'lik kültür kapları (Greiner, Almanya)
- 96 kuyucuklu mikroplaka (Greiner, Almanya)
- 24 kuyucuklu mikroplaka (Greiner, Almanya)
- 12 kuyucuklu mikroplaka (Greiner, Almanya)
- 15 ml ve 50 ml'lik tüpler (Greiner, Almanya)
- 5-10 ve 25 ml hacimli steril pipetler (Greiner, Almanya)
- 1-10, 20-200, 100-1000 µl otomatik pipetler (Eppendorf, Almanya)
- Steril pipet uçları (Greiner, Almanya)
- 1,5 ml'lik mikro tüpler (Isolab, Almanya)
- Fetal dana serumu (FBS) (Invitrogen, USA)
- Hücre ortamı; RPMI 1640 (Invitrogen, USA)
- Tripsin-EDTA (Sigma Aldrich, USA)
- L-Glutamine (Invitrogen, USA)
- Tripan mavisi (Sigma Aldrich, USA)
- Dexamethasone (Sigma Aldrich, USA)
- Tetrodotoksin (Tocris Bioscience, İngiltere)
- Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) (Sigma Aldrich, USA)
- Dimetil sülfoksit (Merck, Almanya)

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre kültürü

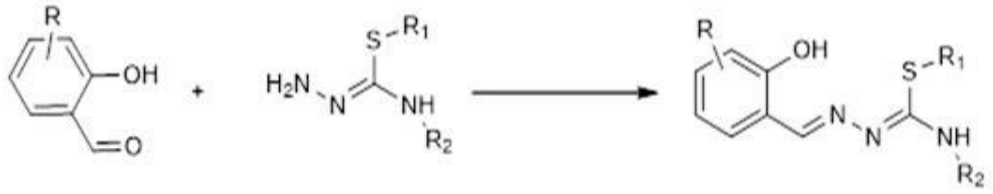
İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden getirilmiş olan Dunning modeli sıçan prostat kanseri MAT-LyLu hücreleri, laboratuarımızda dondurulmuş olarak stokta saklanmakta olup deneyler için pasajlanarak çoğaltılıp takibi yapılmaktadır. Deneyde kullanılan hücreler, Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640, Invitrogen) medium içerisine %1 fetal dana serumu (FBS), 2 mM L-Glutamine ve 250 nM dexamethasone ilave edilerek hazırlanan besi ortamında; %5 CO_2, 37°C sıcaklık ve %100 nem koşullarını sağlayan inkübatörde yaşatılmaktadır.

3.2.2. Deney mediumlarının hazırlanması

Kontrol grubuna MAT-LyLu hücreleri için normal büyüme mediumu olarak kullanılan ilaveli (%1 FBS, 2 mM L-Glutamine ve 250 nM dexamethasone) RPMI-1640 uygulanmıştır.

Harran Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nde sentezlenmiş olan Tiyosemikarbazon türevi 3, 5 - di - tert – butyl salicylaldehyde - S- methyl thiosemicarbazone (3,5 DTBSA-5-Me-TSC) bileşiği (ma: 321.48 g/mol) (Şekil 3.1), ışıktan ve nemden korunarak buzdolabında +4^{o}C'de muhafaza edilmiştir. 10 mM konsantrasyonda stok solüsyon hazırlamak için, bileşik, DMSO içerisinde çözdürülmüştür. Bu stok solüsyon, ilaveli RPMI-1640 ile dilüe edilerek 0.1, 1, 5, 10, 15, 20 ve 25 µM konsantrasyonlarda deney mediumları hazırlanmıştır.

3,5 DTBSA-5-Me-TSC bileşiği için çözücü olarak DMSO kullanıldığından, deney mediumu hazırlanmasında kullanılan oranlarda DMSO, ilaveli mediuma eklenerek DMSO'lu kontrol grupları oluşturulmuştur.



Şekil 3.1. Thiosemicarbazone'ların (TSC) genel sentez şeması: (R, R1, R2 = alkil veya aril grupları)

3,5 DTBSA-5-Me-TSC'nin hücre hareketi üzerindeki etkisinin test edilmesi amacıyla yapılan deneylerde Tetrodotoksin (TTX), pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Spesifik bir sodyum kanal blokeri olan TTX (Cestele ve Catterall, 2000), MAT-LyLu hücre hareketini baskılamaktadır (Grimes ve ark., 1995). TTX, üretici firmanın önerisine göre, steril distile su içerisinde çözdürüldükten sonra elde edilen 3132 µM konsantrasyonlu stok solüsyon porsiyonlanmış; –20ºC'de dondurularak ve ışıktan korunarak saklanmıştır. Deney sırasında, stok TTX solüsyonu ilaveli RPMI-1640 içerisinde seyreltilmiş ve 1 µM konsantrasyonlu medium şeklinde hazırlanmıştır.

3.2.3. Toksisite

Toksisite analizi, yeni sentezlenmiş 3,5 DTBSA-5-Me-TSC bileşiğinin, MAT-LyLu hücreleri üzerinde toksik etki oluşturup oluşturmadığını tespit etmek amacıyla yapılmıştır. 35 mm çaplı steril petrilerin her birine yüzeye homojen dağılacak şekilde $3x10^4$ hücre ekildikten 24 saat sonra mikroskopta kontrol edilmiştir. Kontrol grubundaki petrilere ilaveli RPMI veya ajanların hazırladığı konsantrasyonlarda DMSO içeren kontrol medyumu, deney petrilerine ise belirlenen konsantrasyonlarda 3,5 DTBSA-5-Me-TSC içeren deney mediumları ilave edilmiştir. İki gün süreyle her gün aynı saatte mediumlar yenileri ile değiştirilmiş olup ekimden sonraki 72. saatte, mediumlar pipet yardımı ile uzaklaştırılmış ve petri içerisine 0.8 ml medium ile 0.2 ml %0.4'lük Tripan mavisi eklenmiştir. 37 ºC sıcaklıkta 10 dk'lık inkübasyonun ardından, tripan mavisi içeren medium çıkartılarak taze medium konulmuştur. İnvert mikroskopta (40x), her petride 40 mikroskop alanında canlı ve ölü hücrelerin sayıları belirlemiştir. Her grupta üç petri olacak şekilde deneyler üç kez tekrarlanmıştır.

3.2.4. Hücre kinetiği parametreleri

3.2.4.1. Hücre proliferasyonu

3,5 DTBSA-5-Me-TSC bileşiğinin, sıçan prostat kanseri hücre soyu olan MAT-LyLu hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri, kolorimetrik 3 - (4,5-Dimetiltiazol-2yl) - 2,5 - Difenil tetrazolyum bromid (MTT) yöntemi (Mosmann, 1983) ile Eliza mikroplaka okuyucuda kolorimetrik olarak belirlenmiştir, 96 kuyucuklu steril mikroplakaların her bir kuyucuğuna $3x10^3$ MAT-LyLu hücresi ekilmiştir. 24 saatlik inkübasyondan sonra kontrol grubu kuyucuklarına ilaveli RPMI veya DMSO'lu medium, deney grubu kuyucuklarına ise hücrelere toksik olmayan kosantrasyonlarda 3,5 DTBSA-5-Me-TSC içeren medium konulmuştur. Hergün aynı saatte mediumlar değiştirilmiş ve medium uygulamasından sonraki 24. ve 48. saatlerde kontrol ve deney kuyucuklarına minimum ışıkta 0.1 mg/ml konsantrasyonda hazırlanmış MTT solüsyonu eklenmiştir. Mikroplakalar folyoya sarılarak 37 ^oC inkübatörde 4 saat bekletilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda, kuyucuklar içerisindeki MTT'li medium atılmış, 200 µl DMSO ve 50 µl glisin tamponu eklenmiştir. Mikroplakalar, dakikada 100 devir yapacak şekilde ayarlanmış çalkalayıcıda 15 dk bekletildikten sonra, eliza mikroplaka okuyucuda 570 ve 690 nm dalga boylarında absorbans ölçümleri yapılmıştır. Her grup için bir seride üç kuyucuk kullanılmış olup deneyler 3 kez tekrarlanmıştır.

3.2.4.2. Mitoz indeksi

3,5 DTBSA-5-Me-TSC'nin, hücrelerin mitotik aktivitesi üzerindeki etkisini belirlemek amacı ile 12 kuyucuklu mikroplakaların her kuyucuğuna 15 mm çaplı steril bir lamel yerleştirilmiş ve lamelin üzerinden taşmayacak şekilde 10^4 hücre ekilmiştir. Ekimden 24 saat sonra, deney kuyucuklarına hücreler üzerinde toksik etki yapmayan ve proliferasyon deneyleri sonucunda belirlenmiş konsantrasyonlarda hazırlanmış deney mediumları, kontrol gruplarına ise ilaveli medium ile deney mediumlarının hazırlandığı oranda DMSO içeren kontrol mediumları konulmuştur.

İki gün boyunca her gün aynı saatte medium değiştirilmiştir. İlk medium değişiminden 24 ve 48 saat sonra lamellerdeki hücreler, asetik asit – etanol (1:3) karışımı ile 10 dk fikse edilip 3 kez 5'er dk % 70'lik etanol ile muamele edilmiştir. Lameller, pleytlerden dikkatlice çıkarılıp hücreler üstte kalacak şekilde lamlara yapıştırılmış ve Feulgen yöntemi (Bancroft ve ark., 1990) ile boyama yapılmıştır. Uygulanan yöntemde hidroliz, 5 N hidroklorik asit içinde 1 saat tutularak gerçekleştirilmiş, Schiff ayracının uygulama süresi ise 1 saat olarak belirlenmiştir. Her preparatta ortalama 1000 hücre olmak üzere toplam 4000-6000 hücrede metafaz, anafaz ve telofaz evreleri sayılarak mitotik hücre sayısı (n) tespit edilmiştir. Elde edilen verilerden aşağıdaki formül (3.1.) (Özalpan, 2001) ile mitotik indeks (MI) değerleri (%) hesaplanmıştır:

(3.1)

$$MI = (\text{n}/C) \times 100$$

MI: Mitotik indeks (%)

n: Mitotik hücre sayısı

C: Toplam hücre sayısı

3.2.5. Motilite analizi (yara kapanma yöntemi)

3,5 DTBSA-5-Me-TSC bileşiğinin, güçlü metastatik karaktere sahip sıçan prostat kanser hücresi olan MAT-LyLu hücrelerinin lateral yöndeki hareket yetenekleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bu amaçla öncelikle 35 mm'lik steril petri kaplarının alt yüzeylerine cam kalemi ile 15 adet yatay, 3 adet dikey çizgi çizilmiştir (Şekil 3.1.). Ardından her petriye $15x10^4$ MAT-LyLu hücresi ekilmiştir. CO_2'li inkübatörde 24 saat beklettikten sonra, petrinin tabanını kaplayan hücre tabakası üzerinde steril pipet ucu yadımıyla 3 dikey çizginin hizasında yara izi oluşturulmuştur. Petrilerin mediumları atılıp kontrol [kontrol, pozitif kontrol (TTX, 1 µM) ve DMSO'lu kontrol] ile hücrelere toksik olmayan ve hücre proliferasyonunu etkilemeyen konsantrasyonlarda deney mediumları eklenmiştir. Yatay ve dikey çizgilerin kesiştiği 45 noktadaki yara genişlikleri invert mikroskopta (10x) ölçülmüş ve 0. saat yara genişlik değerleri (W_0) olarak kaydedilmiş ve hergün aynı saatte çalışılmıştır. Petriler, 24 saat inkübe edildikten sonra, 0. saatte ölçüm yapılan

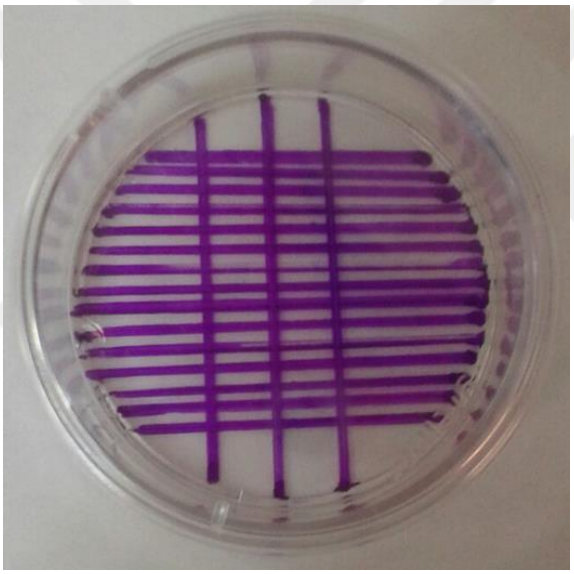
noktalardaki yara genişlikleri ölçülmüş (W_t) ve tekrar mediumları değiştirilerek inkübatöre kaldırılmıştır. Ertesi gün deney saatinde yeniden ölçüm yapılmış ve 48. saat yara genişlikleri (W_t) olarak kaydedilmiştir. Her grup için üçer petri kullanılmış ve her deney üç kez tekrarlanmıştır. Ölçüm sonuçlarından aşağıdaki formül (3.2) kullanılarak her petrideki ortalama motilite indeksi değerleri hesaplanmıştır.

$$M\text{\textbf{?}} = 1 - (W_t/W_0) \quad (3.2)$$

MoI: Motilite İndeksi

W_0: Hücre ekiminden 24 saat sonra, medium değişimi yapılmadan önce ölçülen yara genişlikleri

W_t: Deney mediumları ile 24 ve 48 saat inkübasyonun ardından ölçülen yara genişlikleri



Şekil 3.1. Motilite indeksini belirlemek için kullanılan petrinin alt yüzüne yapılan çizim

3.2.6. İstatistiksel değerlendirme

Deneylerden elde edilen veriler, aritmetik ortalamalar ve her bir ortalama değerin standart hatası (±SH) şeklinde verilmiştir. Gruplar arasında anlamlı bir fark olup olmadığı, Excel (Office 2010) programında ANOVA varyans analizi, student *t*-testi ve yüzde değerlerin karşılaştırılması testi kullanılarak değerlendirilmiş; anlamlılık düzeyi $p \leq 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

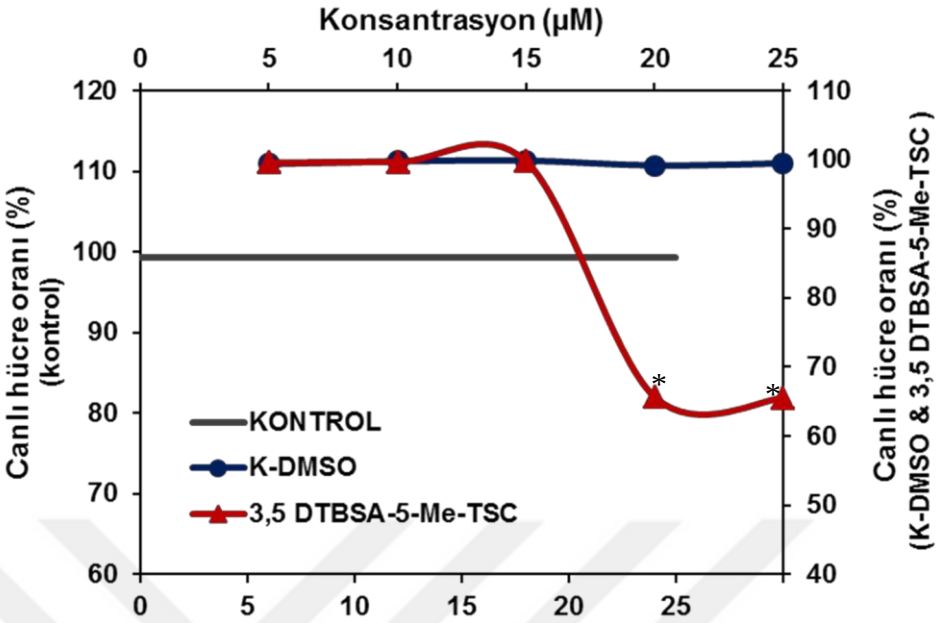
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Yeni sentezlenmiş olan tiyosemikarbazon türevi 3, 5 – di – tert – butyl salicylaldehyde – S – methyl thiosemicarbazone (3,5 DTBSA-5-Me-TSC) bileşiğinin yüksek metastatik özellikteki sıçan prostat kanser hücresi olan MAT-LyLu hücrelerinin proliferasyon ve mitotik aktivite gibi kinetik özellikleri ile lateral yöndeki hareketi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu amaçla öncelikle bileşiğin, MAT-LyLu hücrelerinin üzerinde toksik etki oluşturmayan konsantrasyonları belirlenmiştir. Elde edilen veriler uygun istatistiksel yöntemlerle değerlendirilmiş ve sonuçlar literatür bilgisi ışığında tartışılmıştır.

4.1. Araştırma Bulguları

4.1.1. Toksisite

3,5 DTBSA-5-Me-TSC bileşiğinin (5, 10, 15, 20 ve 25 μM), MAT-LyLu hücrelerine toksik bir etki gösterip göstermediğinin belirlenmesi amacı ile Bölüm 3.2.3.'te anlatılan şekilde tripan mavisi kullanılarak toksisite testi yapılmıştır. Sonuçlara incelendiğinde, 15 μM ve daha düşük konsantrasyonlarda uygulanan TSC'nin MAT-LyLu sıçan prostat kanseri hücreleri üzerinde toksik bir etki meydana getirmezken, bileşiğin, 20 μM ve 25 μM konsantrasyonlarında uygulandığında, canlı hücre oranlarını sırasıyla %65.7 ve %65.5'e düşürdüğü tespit edilmiştir. ($p<0.05$). Ayrıca, deney mediumları ile aynı konsantrasyonda DMSO içeren gruplarda canlı hücre oranlarının (%) kontrol ile benzer olduğu dolayısıyla kullanılan çözücünün toksik etki yapmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.1.). Elde edilen sonuçlar değerlendirilmiş ve deneylere, toksik olmadığı belirlenen 15 μM ve daha düşük konsantrasyonlarla devam edilmiştir.



Şekil 4.1. Toksisite grafiği: MAT-LyLu hücreleri üzerine 3,5 DTBSA-5-Me-TSC bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu elde edilen % canlılık oranları.
*: Kontrol grubuna göre istatistik bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).

4.1.2. Hücre kinetiği üzerindeki etkiler

4.1.2.1. Proliferasyon

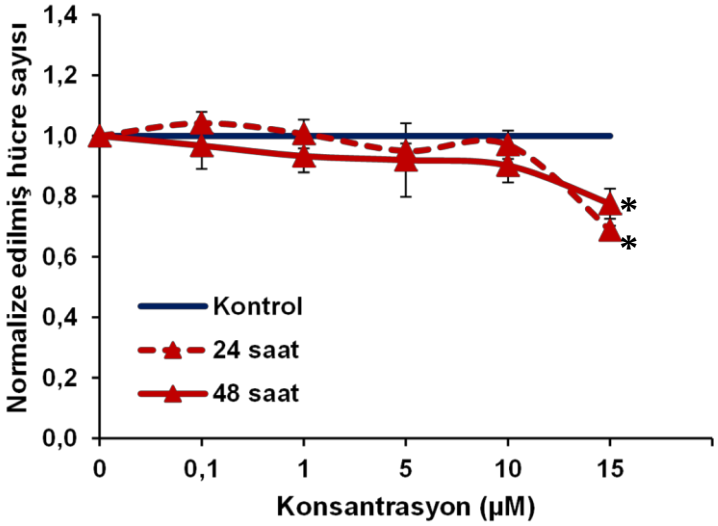
Tiyosemikarbazon türevi 3,5 DTBSA-5-Me-TSC bileşiğinin, MAT-LyLu hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi MTT yöntemi ile belirlenmiştir. Tripan mavisi analizi sonucunda toksik olmadığı belirlenen konsantrasyonlarda (0.1, 1, 5, 10 ve 15 µM) 3,5 DTBSA-5-Me-TSC içeren deney mediumları, 24 ve 48 saat boyunca hücrelere uygulandıktan sonra Bölüm 3.2.4.1.'de anlatılan şekilde MTT yöntemi uygulanmıştır. Ölçümler sonucu elde edilen absorbans değerlerinden normalize edilmiş canlı hücre sayıları ve meydana gelen inhibisyon (%) oranları saptanmıştır. DMSO'lu kontrol gruplarına ait veriler öncelikle kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. İstatistiksel bakımdan anlamlı fark olmadığı ($p>0.05$) tespit edildiğinden DMSO'lu kontrol gruplarının absorbans değerleri 1 kabul edilerek deney gruplarının normalize edilmiş hücre sayıları hesaplanmıştır (Çizelge 4.1.). Bu veriler kullanılarak, normalize edilmiş hücre sayılarının zamana göre grafiği çizilmiştir (Şekil 4.2.). Elde

edilen sonuçlara göre 5 µM, 10 µM ve 15 µM kontrasyonlarda 3,5 DTBSA-5-Me-TSC'nin 24 saat süreyle uygulanması sonucunda normalize edilmiş canlı hücre sayıları sırasıyla 0.95±0.02; 0.97±0.05 ve 0.69±0.01 bulunmuştur. Şekil 4.2. incelendiğinde 48 saat süreyle devam edilen 3,5 DTBSA-5-Me-TSC uygulaması sonucunda canlı hücre sayılarının konsantrasyon artışı ile orantılı olarak azaldığı (0.1 µM TSC: 0.96±0.08 – 15 µM TSC: 0.78±0.05) görülmektedir. Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesiyle 15 µM konsantrasyonda 3,5 DTBSA-5-Me-TSC uygulamasının hem 24. hem de 48. saatte MAT-Lylu hücre proliferasyonunu anlamlı ($p<0.05$) şekilde inhibe ettiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.1., Şekil 4.2.).

Çizelge 4.1. MAT-LyLu hücreleri üzerine farklı konsantrasyonlarda 3,5 DTBSA-5-Me-TSC uygulaması sonucu elde edilen normalize edilen hücre sayıları ve inhibisyon oranları (%).

		Normalize edilmiş hücre sayısı		% İnhibisyon	
		24. saat	48.saat	24. saat	48. saat
3,5 DTBSA-5-Me-TSC	**Kontrol**	1.00±0.00	1.00±0.00	-	-
	0.1 µM	1.04±0.04	0.96±0.08	--	3.21
	1 µM	1.00±0.05	0.93±0.05	--	6.69
	5 µM	0.95±0.02	0.92±0.12	5.00	8.00
	10 µM	0.97±0.05	0.90±0.06	2.92	9.79
	15 µM	0.69±0.01*	0.78±0.05*	31.1*	22.4*

*:Kontrol grubuna göre istatistik bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).



Şekil 4.2. MAT-LyLu hücreleri üzerine 3,5 DTBSA-5-Me-TSC maddesinin farklı konsantrasyonlarda uygulanmasıyla elde edilen normalize edilmiş hücre sayılarının konsantrasyona bağlı grafiği (±SH).
*:Kontrol grubuna göre istatistik bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).

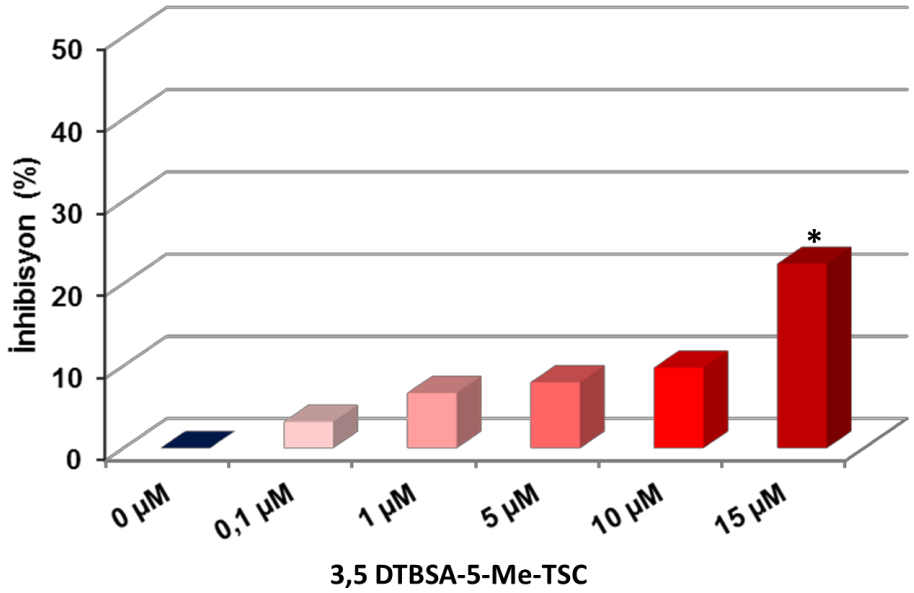
MAT-LyLu hücreleri üzerine 24 ve 48 saat süreyle 3,5 DTBSA-5-Me-TSC uygulaması sonucu oluşan inhibisyon oranları (%), aşağıdaki formül (4.1) ile hesaplanmıştır. Bu işlem için DMSO'lu kontrol gruplarının normalize edilmiş hücre sayıları 100 kabul edilmiştir.

$$İ\text{\textit{ibisy}}(\%) = 100 \quad \frac{N_{K} - N_{De}}{N_{K}} \quad (4.1)$$

×

N: Normalize edilmiş hücre sayısı

3,5 DTBSA-5-Me-TSC bileşiği uygulamasının MAT-LyLu hücreleri üzerinde 24. ve 48. saatlerde oluşturduğu inhibisyon oranları Çizelge 4.1.'de verilmiştir. Hesaplamalar sonucu elde edilen bu veriler kullanılarak çizilen inhibisyon (%) oranlarının konsantrasyona bağlı grafiği de Şekil 4.3.'te izlenmektedir. Çizelge ve grafik incelendiğinde 3,5 DTBSA-5-Me-TSC'nin MAT-LyLu hücreleri üzerinde oluşturduğu inhibisyon oranlarının konsantrasyon ile arttığı, 15 µM 3,5 DTBSA-5-Me-TSC'nin hücre çoğalmasını 48. saatte %22.4 oranında baskıladığı görülmektedir. Elde edilen veriler istatislik bakımından değerlendirildiğinde, 15 µM 3,5 DTBSA-5-Me-TSC'nin uygulanmasıyla oluşan inhibisyonun her iki deney saatinde de anlamlı olduğu ($p<0.05$) tespit edilmiştir.



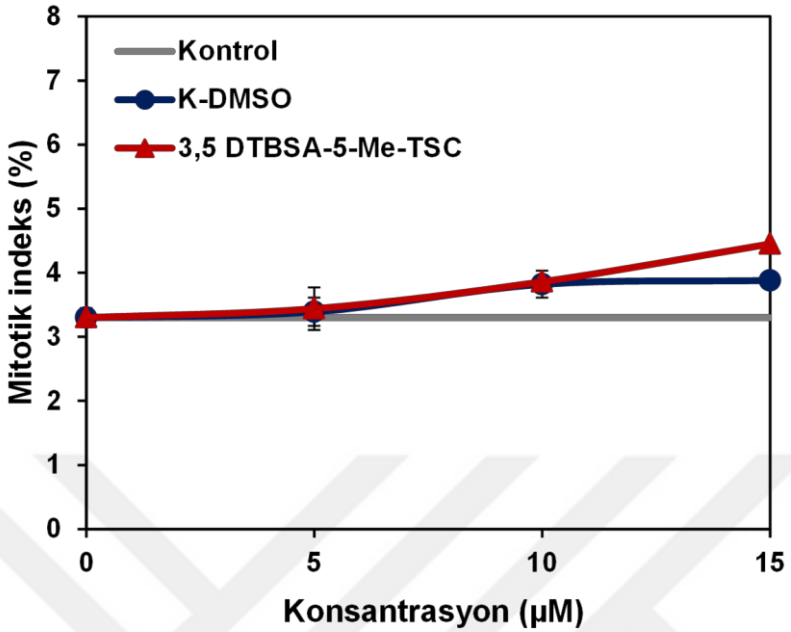
Şekil 4.3. MAT-LyLu hücreleri üzerine 3,5 DTBSA-5-Me-TSC maddesinin farklı konsantrasyonlarda uygulanmasıyla elde edilen inhibisyon oranları (±SH).
*:Kontrol grubuna göre istatistik bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$).

4.1.2.2. Mitoz indeksi

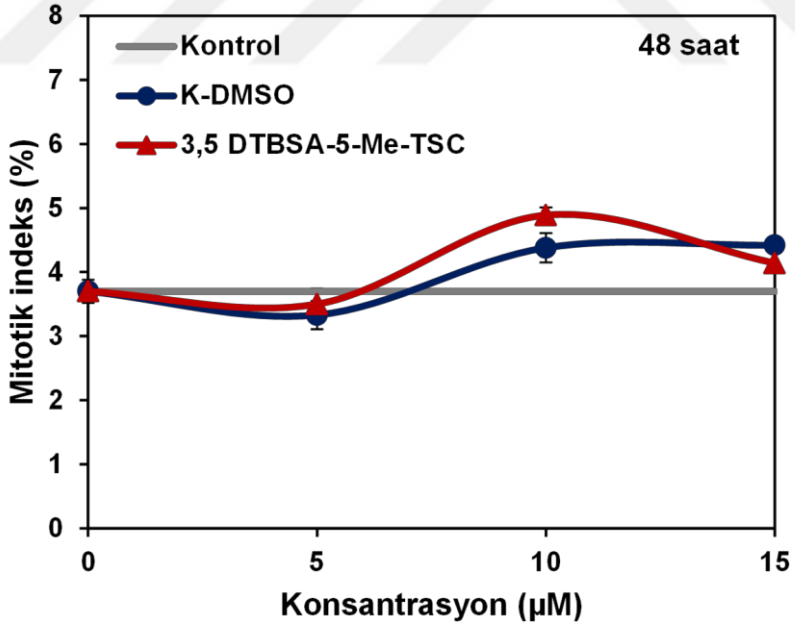
3,5 DTBSA-5-Me-TSC bileşiği, MAT-LyLu hücrelerinin mitotik aktiviteleri üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla, 5, 10 ve 15 µM konsantrasyonlarda 24 saat ile 48 saat sürelerle uygulanmıştır. Bu sürelerin sonunda Bölüm 3.4.2.'de anlatılan şekilde hazırlanan preparatlarda metafaz, anafaz ve telofaz evresindeki hücreler sayılmış, (3.1) nolu formül ile mitoz indeksi (%) hesaplanmış ve veriler Çizelge 4.2.'de gösterilmiştir. Bu tabloda bulunan veriler ile çizilen mitoz indeksi değerlerinin zamana bağlı grafiği de Şekil 4.4.'te görülmektedir. MAT-LyLu hücrelerinin mitoz indeksi değeri kontrol grubunda 24. saatte %3.30±0.14, 48. saatte %3.70±0.12 olarak tespit edilmiştir. DMSO'lu kontrol grubunda saptanan mitoz indeksi verileri de (3.33±0.12 ila 4.42±0.23 aralığı) kontrole benzer bulunmuş olup, istatistiksel bakımdan fark olmadığı ($p>0.05$) belirlenmiştir. Deney gruplarında mitoz indeksi, 24. saatte, 3,5 DTBSA-5-Me-TSC bileşiğinin 5 µM konsantrasyonda uygulanmasıyla %3.44±0.14, 10 µM konsantrasyonda 3.86±0.33 ve 15 µM konsantrasyonda ise 4.45±0.09 olarak saptanmıştır. 3,5 DTBSA-5-Me-TSC uygulamasına 48 saat süreyle devam edilmiş ve bu sürenin sonunda mitoz indeksi değerleri 5, 10 ve 15 µM konsantrasyonlarda sırasıyla 3.50±0.18, 4.89±0.24 ve 4.14±0.12 olarak bulunmuştur. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda, her iki deney saatinde de bileşiğin, MAT-LyLu hücrelerinin mitotik aktivitesi üzerinde istatistiksel bakımdan anlamlı bir fark oluşturmadığı ($p>0.05$) tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2. MAT-LyLu hücreleri üzerine 3,5 DTBSA-5-Me-TSC bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu elde edilen mitoz indeksi (%) değerleri (±SH).

	Mitoz İndeksi (%)	
	24. saat	**48. saat**
Kontrol	3.30±0.14	3.70±0.12
K-DMSO5	3.39±0.15	3.33±0.12
K-DMSO10	3.82±0.22	4.38±0.22
K-DMSO15	3.88±0.21	4.42±0.23
3,5 DTBSA-5-Me-TSC (5 µM)	3.44±0.14	3.50±0.18
3,5 DTBSA-5-Me-TSC (10 µM)	3.86±0.33	4.89±0.24
3,5 DTBSA-5-Me-TSC (15 µM)	4.45±0.09	4.14±0.12



(A)



(B)

Şekil 4.4. MAT-LyLu hücreleri üzerine 3,5 DTBSA-5-Me-TSC bileşiğinin (A) 24 saat (B) 48 saat süreyle uygulanması sonucunda elde edilen mitoz indeksi (%) değerleri.

4.1.3. Hücre hareketi üzerindeki etkiler

Dunning modeli sıçan prostat kanseri hücre soyu olan yüksek metastatik özellikteki MAT-LyLu hücrelerine 3,5 DTBSA-5-Me-TSC bileşiği 5µM ve 10µM konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat sürelerle uygulanmıştır. Deney mediumlarının uygulanmasından önceki (0. saat; W_0) ve sonraki (24. ve 48.saat; W_t) yara genişlikleri invert mikroskopta mikrometrik oküler ile ölçülmüştür. Elde edilen veriler kullanılarak formül (3.2)'de yerine konularak kontrol ve deney gruplarının ortalama motilite indeks değerleri hesaplanmıştır:

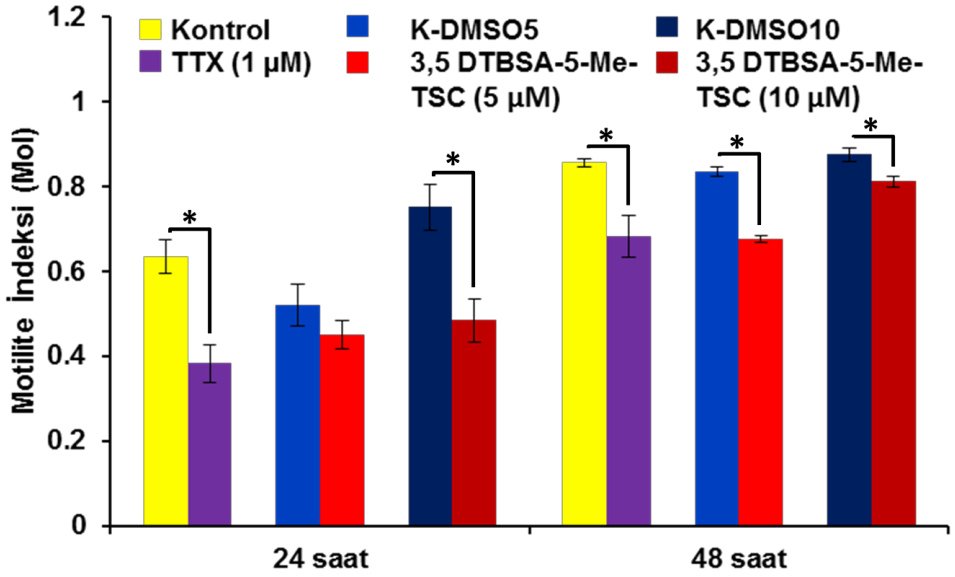
Yüksek metastatik özellikteki MAT-LyLu hücreleri üzerine, bileşik uygulanmasından 24 ve 48 saat sonraki motilite indeks ortalamaları (±SH) ile kontrole göre deney gruplarının motilite indekslerinde meydana gelen değişim (%) oranları Çizelge 4.3.'te verilmiştir. Bileşiğin farklı konsantrasyonlarda uygulanması ile elde edilen motilite indekslerinin zamana göre grafiği de Şekil 4.5.'te görülmektedir. Elde edilen bulgulara göre, MAT-LyLu hücrelerinin motilite indeksleri kontrol ve DMSO'lu kontrol gruplarında benzer olup, gruplar arasında istatistiksel bakımdan anlamlı fark olmadığı ($p>0.05$) görülmüştür. Pozitif kontrol olarak kullanılan TTX (1µM), hücrelerin hareket ettikleri mesafeyi 24. ve 48. saatlerde sırasıyla %39.7 ve %20.3 oranlarında istatistiksel bakımdan anlamlı ($p<0.05$) şekilde azaltmıştır. Bu bulgu bize, çalıştığımız MAT-LyLu hücrelerinin voltaj kapılı sodyum kanallarını eksprese ettiğini yani yüksek metastatik özelliğini koruduğunu göstermektedir. Bu hücrelere, proliferasyon üzerinde herhangi bir etkisi olmayan konsantrasyonlarda (5 ve 10 µM) 3,5 DTBSA-5-Me-TSC'nin 24 ve 48 saat sürelerle uygulanması sonucunda hücrelerin hareket ettikleri mesafenin azaldığı belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre kontrol (K-DMSO5) grubunda 0.83±0.01 olan motilite indeksi 48 saatlik 3,5 DTBSA-5-Me-TSC (5 µM) uygulanması sonucunda % 19.1 oranında azalarak 0.67±0.01'e gerilemiştir. Benzer şekilde, 10 µM'lık 3,5 DTBSA-5-Me-TSC uygulamasının 48. saatin sonunda kontrol (K-DMSO10) grubunda 0.87±0.02 olan motilite indeksini 0.81±0.01'e azalttığı tespit edilmiştir. Veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve 5 µM 3,5 DTBSA-5-Me-

TSC'nin 48; 10 µM TSC'nin ise hem 24 hem de 48 saat süreyle uygulanması sonucunda ölçülen inhibisyonların anlamlı ($p<0.05$) olduğu bulunmuştur.

Çizelge 4.3. MAT-LyLu hücreleri üzerine 3,5 DTBSA-5-Me-TSC maddesinin farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu elde edilen motilite indeksi (±SH) değerleri ve kontrol grubuna oranla deney gruplarının motilite indekslerinde tespit edilen % değişim oranları.

	Motilite İndeksi (MoI) [a]		**Motilite İndeksindeki Değişim (%) [b]**	
	24. saat	**48. saat**	**24. saat**	**48. saat**
Kontrol	0.63±0.04	0.86±0.01	--	--
TTX (1 µM)	0.38±0.04	0.68±0.05	39.7 (↓)* $^{\psi}$	20.3 (↓)*$^{\psi}$
K-DMSO5	0.52±0.05	0.83±0.01	--	--
K-DMSO10	0.75±0.05	0.87±0.02	--	--
3,5 DTBSA-5-Me-TSC (5µM)	0.44±0.03	0.67±0.01	13.5(↓)	19.1 (↓)*$^{\gamma}$
3,5 DTBSA-5-Me-TSC (10µM)	0.48±0.05	0.81±0.01	35.6 (↓)*$^{\gamma}$	7.24 (↓)*$^{\gamma}$

a: MoI = 1 - (W_t / W_0)
b: (↓): Motilite indeksinde azalış.
*: İstatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p<0,05$).
$^{\psi}$: Kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.
$^{\gamma}$: DMSO'lu kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.8. MAT-LyLu hücreleri üzerine 3,5 DTBSA-5-Me-TSC maddesinin farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu elde edilen motilite indeksleri (MoI).
*: İstatistiksel bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$)

4.2. Tartışma

Tiyosemikarbazonlar (TSC) farmakolojik özellikleri nedeniyle oldukça ümit vadeden bileşiklerdir (Sharma ve Pathak, 2016). Bu çalışmada, yeni sentezlenmiş olan 3,5-di-tert-butylsalicylaldehyde-S-methyl thiosemicarbazone (3,5 DTBSA-5-Me-TSC) maddesinin MAT-LyLu hücreleri üzerindeki biyolojik etkileri iki açıdan değerlendirilmiştir: *i.* Hücre kinetiği ve *ii*. Hücre migrasyonu.

MAT-LyLu hücrelerine toksik etki yapmayan 15 μM ve daha düşük konsantrasyonlarda 3,5 DTBSA-5-Me-TSC'nin, en yüksek konsantrasyonda (15 μM) her iki deney saatinde de hücre proliferasyonunu inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bu inhibisyonun mekanizması hakkında ön bilgi edinmek için yapılan mitoz indeksinin belirlenmesi çalışmasında, 3,5 DTBSA-5-Me-TSC uygulaması sonucu hücrelerin mitotik aktivitesinde herhangi bir değişiklik olmadığı görülmüştür. Bu bulgu, 3,5 DTBSA-5-Me-TSC'nin, hücrelerin çoğalması üzerindeki inhibe edici etkisinin, hücre siklusu ile ilişkili olmadığını göstermektedir.

Literatürde, çeşitli tiyosemikarbazon türevlerinin antiproliferatif ve/veya sitotoksik özellikte olup antikanser aktivite sergilediklerini gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır (Kovala-Demertzi ve ark., 2001; Adsule ve ark., 2006; Hernandez ve ark.,2008; Kovala-Demertzi ve ark., 2009; Beytur ve ark., 2011; Kulandaivelu ve ark., 2011; Huang ve ark., 2015)

Brockman ve ark. (1956), 2 formylpyridine thiosemicarbazon adlı bileşiğin antilökemik etkiye sahip olduğunu, ancak aynı zamanda bu bileşiğin toksik etki sergilediğini bulmuşlardır. Daha sonraları French ve ark. (1966), bileşiğin daha az toksisiteye sahip başka türevlerini sentezlemişler ve bunların da L-1210 ve LLC gibi bazı tümörlere karşı etkili olduğunu göstermişlerdir. Beytur ve arkadaşları (2011) ise yeni sentezlenmiş başka bir tiyosemikarbazon türevi bileşiğin, LNCaP insan prostat kanseri hücreleri üzerinde antitümöral aktiviteye sahip olduğunu ve bu etkilerini androjen reseptörü varlığında DNA hasarı oluşturarak sergilediğini ifade etmişlerdir. Patel ve Shah (2012), lösemi, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, kolon kanseri,

merkezi sinir sitemi kanserleri, melanoma, over, böbrek, prostat ve meme kanserlerini kapsayan 60 farklı soyun yer aldığı hücre kültürü paneline uyguladıkları 1- (5 – chloro - 1H – benzimidazol – 2 - yl) ethanone thiosemicarbazone bileşiğinin tüm hücrelerde ortalama %53.2 inhibisyon ile potansiyel bir antikanser ajan olabileceğini göstermişlerdir.

Bazı araştırıcılar, tiyosemikarbazonlara metal iyonlarının bağlanmasıyla bileşiğin biyolojik aktivitesinin arttığını bildirmişlerdir (Buss ve ark., 2004; Bernhardt ve ark., 2009). Richardson ve ark. (2009), 2 – asetil piridine tiyosemikarbazonların, 2-benzoilpiridine tiyosemikarbazon (HBpT) ve dipiridilketone tiyosemikarbazon (HDpT) bileşiklerinden daha fazla demir bağlama özelliğine sahip olduğunu ve dolayısıyla daha potansiyel bir antiproliferatif ajan olduğunu belirtmişlerdir. Platin ve palladium gibi geçiş metallerine sahip heterosiklik tiyosemikarbazon türevlerinin sentezlenip MCF-7 (meme kanseri), A549 (akciğer kanseri), T24 (mesane kanseri) ve L-929 (fibroblast benzeri) hücreleri üzerindeki biyolojik etkinliğinin test edildiği çalışmalarda, bileşiklerin hücreler üzerinde antiproliferatif aktivite sergilediği gösterilmiştir (Kovala-Demertzi ve ark., 2001; Kovala-Demertzi ve ark., 2009). Yeni bir Schiff bazı quioline tiyosemikarbazon-bakır kompleksinin sentezlendiği başka bir çalışmada ise 72 saatlik uygulama sonunda LNCaP ve PC-3 prostat kanseri hücrelerinin çoğalmasının baskılandığı; bu hücreler için bileşiğin IC_{50} değerlerinin 5 ve 7 μM olduğu; bileşiğin, proteazomu inhibe edip apoptozu indüklediği dolayısıyla prostat kanserinin tedavisi için ubikutin-proteazom yolağını hedef alabilecek potansiyel bir antikanser ajan olduğu bildirilmiştir (Adsule ve ark., 2006). Huang ve ark. (2015), çeşitli steroidal tiyosemikarbazon platinum [Pt(II)] komplekslerini sentezlemişler ve bunların içerisinden 9.2 μM'lık IC_{50} değeri ile estrone-17-thiosemicarbazone platinum(II) bileşiğinin HeLa hücre proliferasyonu üzerinde en etkin olduğunu bulmuşlardır. Su ve ark. (2015), tiyosemikarbazon ligandlarının ruthenium(II) arene türevi [(p-cymene) $RuCl_3$ bileşiğinin insan mide kanseri SGC-7901 hücrelerine karşı normal (HEK293T) hücreler üzerindekinden daha yüksek bir toksisite gösterdiğini belirlemişlerdir. Başka bir çalışmada, Amerika Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından tümör kemotrapisi için ikinci sınıf bir metal ilaç olarak kabul edilen Gallium ile

oluşturulmuş tiyosemikarbazon Ga (III) kompleksinin, insan fetal akciğer fibroblast hücrelerine (MRC-5) karşı düşük sitotoksisite sergilediği, buna karşılık NCI-H460 hücrelerinde topoizomeraz I'i inhibe edip belirgin DNA kırıklarına yol açtığı ve G1 fazının uzamasına neden olduğu tespit edilmiştir (Qi ve ark., 2017).

Çalışmamızda, 3,5 DTBSA-5-Me-TSC uygulaması sonucu hücrelerin proliferasyonu baskılanırken mitotik aktivitesinde herhangi bir değişiklik olmadığı görülmüştür. Bu nedenle 3,5 DTBSA-5-Me-TSC'nin, hücre çoğalması üzerindeki inhibe edici etkisinin, hücre siklusu dışındaki bir mekanizma ile başarıldığı anlaşılmaktadır. Bu mekanizmanın anlaşılabilmesi için ileri çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Çalışmanın ikinci aşamasında bileşiğin yanal yöndeki hücre hareketi üzerindeki etkisi yara kapanma analizi ile araştırılmıştır. Elde edilen bulgulara göre, hücre proliferasyonunu etkilemeyen 5 ve 10 μM konsantrasyonlardaki 3,5 DTBSA-5-Me-TSC, yüksek metastatik özellikteki MAT-LyLu hücrelerinin hareketini baskılamıştır. Bu etki konsantrasyon ile artmıştır. 5 μM 3,5 DTBSA-5-Me-TSC, 48 saatlik uygulama sonucunda hücre hareketini inhibe ederken, 10 μM 3,5 DTBSA-5-Me-TSC hem 24. hem de 48. saatlerde hücrelerin hareket ettiği mesafeyi azaltmıştır. Ancak bu azalma, uygulama süresinden bağımsız olarak gelişmiştir. Ayrıca, pozitif kontrol olarak kullandığımız TTX (1 μM), VGSC'leri aşırı şekilde eksprese eden ve sahip olduğu yüksek metastatik özellik VGSC'ye bağlı olan MAT-LyLu hücrelerinin hareketini baskılamıştır. Bu sonuçlar da bize kullandığımız hücrelerin deneyler sırasında VGSC'leri eksprese ettiğini ve metastatik özelliklerini koruduğunu göstermektedir. Bütün sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, 3,5 DTBSA-5-Me-TSC bileşiğinin hücre hareketini azaltma etkisinin VGSC aracılı olduğu söylenebilir. Ancak bu etkinin genotipik olarak gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek için moleküler analizler yapılmalıdır.

Semikarbazon (SC) ve tiyosemikarbazon (TSC)'ların karbamazepin (CBZ: 5*H*-dibenz[*b,f*]azepine-5-carboxamide) ile evrimsel olarak benzer gruplara sahip oldukları bilinmektedir (Beraldo ve Gambino, 2004). Uzun yıllardır antiepileptik bir

ilaç olarak kullanılmakta olan CBZ, VGSC'leri voltaja bağlı olarak bloklamaktadır (Ambrosio ve ark., 2002). Çeşitli araştırmalarla CBZ'nin, VGSC'lerin bloklanmasının yanı sıra voltaj kapılı Ca^{2+} ve K^{+} kanalları üzerinde de çeşitli etkilere [inhibisyon (Ca^{2+}: Ambrosio ve ark., 1999; K^{+}: Olpe ve ark., 1991) veya aktivasyon (K^{+}: Zona ve ark., 1990)] sahip olduğu belirtilmiştir. CBZ türevi bileşikler olan BIA 2-059 (Bonifacio ve ark., 2000), BIA 2-093 (Bonifacio ve ark., 2001) ve okskarbazepin (Wamil ve ark., 1991) CBZ ile benzer şekilde VGSC'leri bloklamaktadır. Ilyin ve ark. (2005), 4-(4-Fluorophenoxy)benzaldehyde semicarbazone (V102862) bileşiğinin VGSC'leri bloklayarak atikonvulsan aktivite sergilediğini göstermişlerdir. Aly ve ark. (2010), 4(3H)-quinazolinone-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone bileşiği ile onun bakır ve çinko komplekslerinin antikonvulsan ve analjezik aktiviteye sahip olduğunu bildirmiştir. Farklı tiyosemikarbazon türevlerinin potansiyel antimetastik etkilere sahip olduğu çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir. 3-bromophenyl-2′-fluorophenyl thiosemicarbazone bileşiğinin, DU145 prostat kanseri hücrelerinde, katepsin B ve L'yi inhibe ederek invazyonu baskıladığı böylece antimetastatik aktiviteye sahip olabileceği tespit edilmiştir (Kumar ve ark., 2010). Tiyosemikarbazon-demir şelatlayıcılarının Siklin D1, ribonükleotid redüktaz, p21 gibi molekülleri inhibe ederek hem kanserin ilerlemesini durdurucu hem de metastaz baskılayıcı NDRG1'i up regüle ederek metastazı engelleyici etki yapabileceği bildirilmiştir (Kovacevic ve Richardson, 2012).

Bu tez çalışmasında biyolojik aktivitesini incelediğimiz bileşiğin, VGSC'leri aşırı şekilde ekspese eden ve metastatik yeteneği VGSC'lerle ilişkili olan MAT-LyLu hücrelerindeki hareketi azaltması nedeniyle bu bileşiğin ve sentez edilebilecek başka türevlerinin, antiproliferatif ve antimetastatik amaçlarla kullanılabileceği düşünülmektedir. Etki mekanizmasını tam olarak aydınlatabilmek için ileri moleküler araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Tiyosemikarbazon türevi 3, 5 - di - tert – butyl salicylaldehyde - S- methyl thiosemicarbazone (3,5 DTBSA-5-Me-TSC) (ma: 321,48 g) bileşiğinin, Dunning modeli sıçan prostat kanseri yüksek metastatik özellikteki MAT-LyLu hücrelerinin kinetik özellikleri ile bu hücrelerin hareketi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmada aşağıdaki sonuçlara varılmıştır:

1. 3,5 DTBSA-5-Me-TSC bileşiğinin 20 μM ve daha yüksek konsantrasyonlarda MAT-LyLu hücrelerine karşı toksik etki yaptığı tespit edilmiştir. Bu nedenle hücre proliferasyonu deneylerinde en yüksek 15 μM kullanılmıştır. Pozitif kontrol Tetrodotoksin (TTX) (1 μM) ile deneylerde kullanılan konsantrasyonlarda çözücü (DMSO) içeren kontrol (KD) mediumlarının hücreler üzerine toksik etki yapmadığı belirlenmiştir.

2. MAT-LyLu hücreleri üzerine 48 saat süreyle uygulanan 3,5 DTBSA-5-Me-TSC bileşiği sadece çalışılan en yüksek (15 μM) konsantrasyonda proliferasyonu inhibe etmiştir. 48 saatlik uygulama sonucunda hücre proliferayonu inhibisyon oranının %20.4 olduğu tespit edilmiştir.

3. Dunning modeli sıçan prostat kanseri hücre soyu olan ve VGSC'leri kodlayan genlerden *SCN9A*'yı (Nav1.7) aşırı şekilde eksprese ettiği bilinen MAT-LyLu hücreleri, VGSC'lerin aşırı ekspresyonu nedeniyle yüksek metastatik özelliğe sahiptir (Diss ve ark., 2001). Bu yüzden MAT-LyLu hücreleri metastaz çalışmaları için iyi bir deneysel model olarak tercih edilmektedir. Literatürde, VGSC blokeri olan TTX'in 600 nM, 1 μM ve 6 μM gibi farklı konsantrasyonlarda MAT-LyLu hücre hareketini ve *SCN9A* gen ekspresyonunu baskıladığı bildirilmiştir (Grimes ve ark., 1995; Grimes ve Djamgoz, 1998; Djamgoz ve ark., 2001; Fraser ve ark., 2003). Bu çalışmada pozitif kontrol olarak kullandığımız 1 μM TTX, hücrelerin lateral yöndeki hareketini kontrole göre oldukça azaltmıştır. Bulgularımız çalışmalarımızda

kullanmakta olduğumuz MAT-LyLu hücre soyunun yüksek metastatik özelliğini koruduğunu göstermektedir.

4. Motilite indeksi sonuçlarına göre 3,5 DTBSA-5-Me-TSC bileşiği 5 ve 10 μM konsantrasyonlarda 48 saat süreyle uygulama sonucunda MAT-LyLu hücrelerinin lateral yöndeki hareketini baskılamıştır. Bileşik, motilite indeksi üzerindeki bu etkisini hücre proliferasyonunu etkilemeyen konsantrasyonlarda başarmıştır.

Tüm bulgular birlikte incelendiğinde; 3,5 DTBSA-5-Me-TSC bileşiğinin yüksek konsantrasyonlarının antiproliferatif, düşük konsantrasyonlarının ise VGSC blokeri antimetastatik ajan olarak değerlendirilme potansiyelinin bulunduğu görülmektedir. Bileşiğin sergilediği bu biyolojik aktivitelerin temelinde yatan mekanizmaların aydınlatılması için ileri moleküler araştırmalar yapılmalıdır.

.

KAYNAKLAR

ABDUL, M., ve HOOSEIN, N., 2002. Voltage-gated sodium ion channels in prostate cancer. expresion and activity. Anticancer Research, 22(3):1727-1730.

ABATE-SHEN, C., ve SHEN, M. M., 2002, Mouse models of prostate carcinogenesis. Trends Genet, 18 (5): 2420-34.

ADRİAN, F., PAYNE.KAJ, S., and PENNİE, F., 2008. Managing The Co-Creation Of Value. Journal of The Academy of Marketing Science, 36: 83-96.

ADSULE, S., BARVE, V., CHEN, D., AHMED, F., DOU, Q.P., PADHYE, S., and SARKAR, F.H. 2006. Novel Schiff Base Copper Complexes of Quinoline-2 Carboxaldehyde as Proteasome Inhibitors in Human Prostate Cancer Cells. J. Med. Chem, 49: 7242-7246.

ALLEN, D.H., LEPPLE-WIENHUES, A., and CAHALAN, M.D., 1997. Ion channel phenotype of melanoma cell lines. The Journal Membrane Biology, 155: 27–34.

ALOMONE LABS., 2018. Tetrodotoxin (TTX): A Classic Blocker of a Subset of Nav Channels. [online], https://www.alomone.com/p/tetrodotoxin-citrate-free/T-500, [Ziyaret tarihi: 06/04/2018].

ALY, M. M., MOHAMED, Y. A., EL-BAYOUKI, K. A. M., BASYOUNI, W. M. ABBAS, S. Y. 2010. Synthesis of some new 4(3H)-quinazolinone-2-carboxaldehyde thiosemicarbazones and their metal complexes and a study on their anticonvulsant, analgesic, cytotoxic and antimicrobial activities – Part-1. Eur J Med Chem., 45(8): 3365-3373.

AMBROSIO, A. F., SILVA, A. P., MALVA, J. O., SOARES-DA-SILVA, P., CARVALHO, A. P., CARVALHO, C. M., 1999. Carbamazepine inhibits L-type Ca2+ channels in cultured rat hippocampal neurons stimulated with glutamate receptor agonists. Neuropharmacology, 38; 1349–1359. European Journal of Medicinal Chemistry, 45(8):3365-3373.

AMBROSIO, A. F., SOARES-DA-SILVA, P., CARVALHO, C. M., CARVALHO, A. P., 2002. Mechanisms of action of carbamazepine and its derivatives, Oxcarbazepine, BIA 2-093, and BIA 2-024. Neurochemical Research, 27 (1/2); 121 – 130.

ANDERSON, J. D., HANSEN, T. P., LENKOWSKI, P. W., WALLS, A. M., CHOUDHURY, I. M., SCHENCK, H. A., FRIEHLING, M., HOLL, G. M., PATEL, M. K., SIKES, and BROWN, M. L. A, 2003. Epidermal growth factor potentiates in vitro metastatic behaviour of human prostate cancer PC-3M cells: involvement of voltage-gated sodium channel. Moleculer Cancer, 1149–1154.

ANONİM, 2018. Pufferfish, Blowfish, Fugu - Poison Sushi? [online], http://www.factzoo.com/fish/pufferfish-blowfish-fugu-poisonous-sushi.html, [Ziyaret tarihi: 06/04/2018].

ANTHOLINE, W. E., 1976. İnhibition of tumor cell transplantability by iron and copper complexes of 5-substituted 2-formylpyridine thiosemicarbazones. J Med Chem, 19(2):339-41.

ASHCROFT, F.M., 2006. From molecule to malady. Nature, 440 (23): 440-447.

BAE, D. H., JANSSON, P. J., HUANG, M. L., KOVACEVİC, Z., KALİNOWSKİ, D., LEE, C. S., 2013. The role of NDRG1 in the pathology and potential treatment of human cancers. J Clin Pathol, 66(1-2): 911–7.

BANCROFT, J.D., STEVENS, A., TURNER, D.R., (Ed), 1990. Theory and practice of histological techniques. 3rd ed., Longman Group, UK, pp. 149-189

BANDYOPADHYAY, S., PAİ, S. K., GROSS, S. C., HİROTA, S., HOSOBE, S., and MİURA, K., 2003. The NDRG-1 Gene Suppresses Tumor Metastasis in Prostate Cancer. Cancer Res, 63(21): 1731–1736.

BANERJEE D., YOGEESWARI P., BHAT P., THOMAS A., SRIVIDYA M., SHRIRAM D., 2011. Novel isatinyl thiosemicarbazones derivatives as potential molecule to combat HIV-TB co-infection. Eur J Med Chem, 46(1): 106-121.

BANYARD, J., ve ZETTER, B. R., 1999. The role of cell motility in prostate cancer. Cancer and Metastasis Reviews, 17: 449-458.

BERNARD, G., ve SHEVELL, M. I., 2008. Chanellopathies: a review. Pediatric Neurology, 38(2): 73-85.

BERALDO, H. & GAMBINO, D., 2004. The wide pharmacological versatility of semicarbazones, thiosemicarbazones and their metal complexes. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 4: 31-39.

BERNHARDT, P. V., SHARPE, P. C., ISLAM, M., LOVEJOY, D. B., KALINOWSKI, D. S., and RICHARDSON, D. R. 2009. Iron chelators of the dipyridylketone thiosemicarbazone class: precomplexation and transmetalation effects on anticancer activity. J. Med. Chem., 52:407–415.

BEYTUR, A., TEKİN, S., KELEŞTİMUR, T., ERGİN, Z., SANDAL, S., 2011. Yeni Sentezlenen Bir Tiyosemikarbazon Türevinin Prostat Kanseri Hücre Kültürleri Üzerine Antikanserojenik Özelliklerinin Belirlenmesi: In Vitro Bir Çalışma. F.Ü.Sağ.Bil.Tıp Derg., 25(1): 25 – 32.

BLANDINO, J. K., VIGLIONE, M. P., BRADLEY, W. A., OIE, H. K., and KIM, Y. I., 1995. Voltage-dependent sodium channels in human small-cell lung cancer cells: role in action potentials and inhibition by Lambert-Eaton syndrome IgG. J Membr Biol, 143(2): 153-163.

BROCKMAN, R. W., THOMSON, J. R., BELL, M. J., SKIPPER, H. E., 1956. Observations on the antileukemic activity of pyridine -2-carboxaldehde thiosemicarbazone and thiocarbohydrazone. Cancer Res, 16(2): 167-70.

BUSS, J. L.; GREENE, B. T.; TURNER, J.; TORTI, F. M.; TORTI, S. V. 2004. Iron chelators in cancer chemotherapy. Curr. Top. Med. Chem., 4: 1623–1635.

BONİFÁCİO, M. J. and SOARES-DA-SİLVA, P. 2000. Effects of BIA 2-059 and BIA 2-093 on rat brain voltage-dependent sodium channels. Eur. J. Neurosci. 12 (Suppl. 11): 11.20, p158.

BONİFACİO, M. J., SHERİDAN, R. D. PARADA, A., CUNHA, R. A., PATMORE, L. and SOARES-DA-SİLVA, P,. 2001. Interaction of the Novel Anticonvulsant, BIA 2-093, with Voltage-Gated Sodium Channels: Comparison with Carbamazepine. Epilepsia, 42(5): 600–608.

BOSTWICK, D. G., and CHANG, L., 1999. Overdiagnosis of prostatic adenocarcinoma. Seminars in Urologic, 17(4):199-205.

BOSTWICK, D. G., BURKE, H. B., DJAKIEW, D., EULING, S., HO, S. M., LANDOLPH, J., MORRISON, H., SONAWANE, B., SHIFFLETT, T.,

WATERS, D. J., TIMMS, B., 2004. Human prostate cancer risk factors. Cancer, 101(10 Suppl): 2371-2490.

BRACKENBURY, W. J., CHIONI, A. M., DISS, J. K. J. and DJAMGOZ, M. B., 2007. The neonatal splice variant of Nav1.5 potentiates in vitro invasive behaviour of MDA-MB-231 human breast cancer cells. Breast Cancer Res. Treat., 101; 149–160.

BRITTA, E. A., BARBOSA SILVA, A. P., UEDA-NAKAMURA, T, DIAS-FILHO, B. P., SILVA, C. C., SERNAGLIA, R. L., NAKAMURA, C. V., 2012. Benzaldehyde Thiosemicarbazone Derived from Limonene Complexed with Copper Induced Mitochondrial Dysfunction in Leishmania amazonensis. PLoS ONE 7(8): e41440. doi:10.1371/journal.pone.0041440.

BRITTA, E. A., SCARIOT, D. B., FALZIROLLI, H., SILVA, C. C., UEDA-NAKAMURA, T., DIAS-FILHO, B. P., BORSALI, R., NAKAMURA, C. V., 2015. 4-Nitrobenzaldehyde thiosemicarbazone: a new compound derived from S-(-)-limonene that induces mitochondrial alterations in epimastigotes and trypomastigotes of Trypanosoma cruzi. Parasitology, 142: 978–988.

BUBENDORF, L., SCHÖPFER, A., WAGNER, U., SAUTER, G., MOCH, H., WILLI, N., GASSER, T. C. and MIHATSACH, M. J., 2000. Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589 patients. Hum Pathol, 31(5): 578-583.

CANADAS, M., LOPEZ-TORRES, E., MARTİNEZ-ARİAS, A., MENDİOLA, M.A., and SEVİLLA, M, T., 2000. Spectroscopic and Electrochemical properties of nickel (II), iron (III) and cobalt (II) complexes with benzilbisthiosemicarbozone-importance of working conditions and the metal salt used in the final complex. Polyhedron, 19(18-19): 2059-2068.

CATTERALL, W.A., CESTELE, S., YAROV-YAROVOY, V., YU, F., KONOKI, K., and SCHEUER, T., 2007. Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. Toxicon, 49: 124–141.

CESTELE, S., ve CATTERALL, W. A., 2000. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. Biochimie, 82(9-10): 883-892.

CHEN, J., HUANG, YW., LIU, G., AFRASIABI Z, SINN E, PADHYE S., 2004. The cytotoxicity and mechanisms of 1,2-naphthoquinone thiosemicarbazone and its metal derivatives against MCF-7 human breast cancer cells. Toxicol Appl Pharmacol, 197: 40–48.

CHUA, H. H., ve CHEW, L. P., 2009. Puffer fish poisoning: a family affair. Medical Journal of Malaysia, 64(2): 181-182

COLLINS, A.T., ve MAITLAND, N.J., 2006. Prostate cancer stem cells. European Journal of Cancer, 42(9): 1213-1218.

COSTA, R. F. F., ROBELLED, A. P., MATENCIO, T., CALADO, H. D. R., ARDISSON, J. D., CORTES, M. E., RODRIGUES, B. L., and BERALDO, H., 2005. Metal Complexes of 2-benzoylpyridine derived thiosemicarbazones: Structural, electrochemical and biological studies Journal of Coordiration Chemistry. 58(15): 1307-1319.

DE MARZO, A. M., PLATZ, E. A., SUTCLIFFE, S., XU, J., GRÖNBERG, H., DRAKE, C. G. and NELSON, W. G., 2007. Inflammation in prostate carcinogenesis. Nature Reviews Cancer, 7(4): 256-269.

DENIS, L., MORTON, M. S., and GRIFFITHS, K., 1999. Diet and its preventive role in prostatic disease. European Urology, 35(5-6): 377-387.

DISS, J. K., ARCHER, S. N., HIRANO, J., FRASER, S. P. and DJAMGOZ, M. B. A., 2001. Expression profiles of voltage-gated Na+ channel α-subunit genes in rat and human prostate cancer cell lines. The Prostate, 9: 83-91.

DISS, J. K. J., FRASER, S. P., DJAMGOZ, M. B. A., 2004, Voltage-gated Na+ channels: multiplicity of expression, plasticity, functional implications and pathophysiological aspects. European Biophysics Journal, 33: 180-193.

DISS J. K., STEWART, D., PANI, F., FOSTER, C. S., WALKER, M. M., PATEL, A., and DJAMGOZ, M. B. A., 2005. A Potential novel marker for human prostate cancer: Voltage-gated sodium channel expression in vivo. Prostate Cancer & Prostatic Diseases, 8: 266-273.

DİZDAR, Y., 2003. Prostat Kanseri: Tanı ve Tedavi Seçenekleri. Tanı,1: 36-37.

DJAMGOZ, M. B. A., MYCIELSKA, M., MADEJA, Z., FRASER, S. P. and KOROHODA, W., 2001. Directional movement of rat prostate cancer cells in direct-current electric field: involvement of voltage-gated Na+ channel activity. Journal of Cell Science Journal of Cell Science, 114: 2697-2705.

DJAMGOZ, M. B. A., 2014. Biophysics of Cancer: Cellular Excitability ("CELEX") Hypothesis of Metastasis. J Clin Exp Oncol., S1: 005.

ERÖZENCİ, A., 2003. Prostat büyümesi ve prostat kanseri. Actual Medicine, 11(3): 25-28.

FERRARI, M. B., FAVA, G. G., LEPORATI, E., PELOSI, G., ROSSI R, TARASCONI, P., ALBERTINI, R., BONATI, A., LUNGHI, P., PINELLI, S., 1998. Synthesis, characterisation and biological activity of three copper (II) complexes with a modified nitrogenous base: 5-formyluracil thiosemicarbazone. J Inorg Biochem., 70(2): 145-154.

FERRARI, M. B., CAPACCHI, S., PELOSI, G., REFFO, G., TARASCONI, P., ALBERTINI, R., PINELLI, S., LUNGHI, P., 1999. Synthesis, structural characterization and biological activity of helicin thiosemicarbazone monohydrate and a copper(II) complex of salicylaldehyde thiosemicarbazone. Inorganica Chimica Acta, 286: 134–141.

FIGUEROA, J.A., DE RAAD, S., TADLOCK, L., SPEIGHTS, V.O., and RINEHART, J.J., 1998. Differential expession of insulin-like growth factor binding proteins in high versus low gleason score prostate cancer. The Journal of Urology, 159(4): 1379- 1383.

FISKE, J. L., FOMIN, V. P., BROWN, M. L., DUNCAN, R. L., and SIKES, R. A, 2006. Voltage sensitive ion channels and cancer. Cancer Metastasis Reviews, 25: 493-500.

FOZZARD, H. A. and LIPKIND, G. M., 2010. The tetrodotoxin binding site is within the outer vestibule of the sodium channel. Marine Drugs, 8: 219–234.

FRASER, S.P., DING, Y., LIU, A., FOSTER, C.S., amd DJAMGOZ, M.B.A., 1999. Tetrodotoxin suppresses morphological enhancement of the metastic Mat-LyLu rat prostate cancer cell line. Cell Tissue Res, 295, 505-512.

FRASER, S. P., SALVADOR, V., MANNING, E. A., MIZAL, J., ALTUN, S., RAZA, M., BERRIDGE, R. J., and DJAMGOZ, M. B. A., 2003. Contribution of functional voltage-gated Na+ channel expression to cell behaviors involved in the metastatic cascade in rat prostate cancer: I. Lateral motility. Journal of Cellular Physiology, 195(3): 479-487.

FRASER, S.P:, DISS, J.K.J. LLOYD, L.J., PANI, F., CHIONI, A.M., GEORGE, A.J.T., and DJAMGOZ, M.B.A., 2004. T-lymphocyte invasiveness: control by voltage-gated Na+ channel activity. FEBS Letters, 569, 191–194.

FRASER, S. P., DISS, J. K., CHIONI, A. M., MYCIELSKA, M. E., PAN, H., YAMACI, R. F., PANI, F., SIWY,Z., KRAKOWSKA, M., GRZYWNA, Z., BRACKENBURY, W. J., THEODOROU, D., KOYUTURK, M., KAYA, H., BATTALOGLU, E., TAMBURO DE BELLA, M., SLADE, M. J., TOLHURST, R., PALMIERI, C., JIANG, J., LATCHMAN, D. S., COOMBES, R. C., and DJAMGOZ, M. B. A., 2005. Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis, Clin.Cancer Res, 11(15): 5381–5389

FRASER, S.P., OZERLAT-GUNDUZ, I., ONKAL, R., DISS, J.K.J., LATCHMAN, D.S., and DJAMGOZ, M.B.A., 2010. Estrogen and non-genomic upregulation of voltage- gated Na+ channel activity in MDA-MB-231 human breast cancer cells: role in adhesion. J. Cell. Physiol, 224, 527–539.

FRENCH, F. A., & BLANZ, E. J. Jr., 1966. The Carcinostatic Activity of Thiosemicarbazones of Formyl Heteroaromatic Compounds. III. Primary Correlation. J. Med. Chem., 9: 585–589.

FULGENZI G., GRACIOTTI L., FARONATO M., SOLDOVIERI M. V., MICELI F., AMOROSOC, S., ANNUNZIATO L., PROCOPIO, A., and TAGLIALATELA M., 2006. Human neoplastic mesothelial cells express voltage-gated sodium channels involved in cell motility. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 68(1): 1146–1159.

GAO, R., WANG, J., SHEN, Y., LEI, M., and WANG, Z., 2009. Functional expression of voltage-gated sodium channels Nav1.5 in human breast caner cell line MDA-MB- 231. J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci., 29(1): 64-67.

GAO, R., SHEN, Y., CAI, J., LEI, M., and WANG, Z., 2010. Expression of voltage-gated sodium channel • subunit in human ovarian cancer. Oncology Reports, 23(5): 1293- 1299.

CELESIA, G. G., 2001. Disorders of membrane channels or channelopathies. Clinical Neurophysiology, 112: 2-18.

GAUTIER, M., DHENNIN-DUTHILLE, I., AY, A. S., RYBARCZYK, P., KORICHNEVA, I., and OUADID-ADIDOUCH, H., 2014. New insights into pharmacological tools to TR(i)P cancer up. Br J Pharmacol, 171(10): 2582-2592.

GILLET, L., ROGER, S., BESSON, P., LECAILLE, F., GORE, J., BOUGNOUX, P., LALMANACH, G., and LE GUENNEC, J. Y., 2009. Voltage-gated sodium channel activity promotes cysteine cathepsin-dependent ınvasiveness and colony growth of human cancer cells. J Biol Chem., 284(13): 8680-8691.

GOLDIN, A.L., 2003. Mechanisms of sodium channel inactivation. Current Opinion in Neurobiology, 13: 284–290.

GORDIENKO, D.V., ve TSUKAHARA, H., 1994. Tetrodotoxin-blockable depolarization- activated Na+ currents in a cultured endothelial cell line derived from rat interlobar artery and human umbilical vein. Pflugers Arch, 428(1): 91–93.

GRIMES, J. A., FRASER, S. P., STEPHENS, G. J., DOWNING, J. E., LANIADO, M. E., FOSTER, C. S., ABEL, P. D., and DJAMGOZ, M. B., 1995.

Differential expression of voltage-activated Na+ currents in two prostatic tumour cell lines: contribution to invasiveness in vitro. FEBS Letters, 369(2-3): 290-294.

GRIMES, J. A., ve DJAMGOZ, M. B., 1998. Electrophysiological characterization of voltage-gated Na+ current expressed in the highly metastatic MAT-LyLu cell line of rat prostate cancer. Journal of Cellular Physiology, 175(1): 50-58.

HANAHAN, D. ve WEINBERG, R.A., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell, 114(5): 646-674

HANIFIN, C. T. 2010. The chemical and evolutionary ecology of tetrodotoxin (TTX) toxicity in terrestrial vertebrates. Marine Drugs, 8(3): 577-593.

HAYDAROĞLU, A., 2007. Ege Üniversitesi'nde kanser kayıt analizleri: 34134 Olgunun değerlendirmesi. Türk Onkoloji Dergisi, 22(1): 22-28.

HELLERSTEDT, B. A., ve PIENTA, K. J., 2002. The current state of hormonal therapy for prostate cancer. CA Cancer Journal for Clinicians, 52(3): 154-179.

HERNANDEZ, W., PAZ, J., VAISBERG, A., SPODINE, E., RICHTER, R. and BEYER, L., 2008. Synhesis, characterization, and in vitro cytotoxic activities of benzaldehyde thiosemivarbazone derivatives and their palladium (II) and platinum (II) complexes against various human tumor cell lines. Bioinorganic Chemistry and Applications, 2008: Article ID: 690952, 9 pages.

HERNANDEZ-PLATA, E., ORTIZ, C. S., MARQUINA-CASTILLO, B., MEDINA- MARTINEZ, I., ALFARO, I., BERUMEN, J., RIVERA, M., and and GOMORA, J. C., 2011. Over expression of Nav1.6 channels is associated with the invasion capacity of human cervical cancer. Inter Jour of Cancer, Doi: 10.1002/ijc.26210.

HIGGINS, C. F., 2007. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. Nature, 446: 749–57.

HILLE, B., 2001. Ionic Channels of Excitable Membranes. 3rd, Ed. Sinauer Associates Inc, Canifornia, 847s.

HOBEIKA, A. C., ETIENNE, W., TORRES, B. A., JOHNSON, H. M., and UBRAMANIAM, P. S., 1999. IFN-γ induction of p21WAF1 is required for cell cycle inhibition and suppression of apoptosis. Journal of Interferon and Cytokine Research, 19(12): 1351-1361.

HOUSE, C. D., VASKE, C. D., SCHWARTZ, A. M., OBIAS, V., FRANK, B., LUU, T., SARVAZYAN, N., IRBY, R., STRAUSBERG, R. L., HALES, T. G., STUART, J. M., and LEE, N. H., 2010. Voltage-gated Na+ channel SCN5A is a key regulator of a gene transcriptional network that controls colon cancer invasion. Cancer Res., 70(17): 6957-6967.

HUANG, Y., KONG, E., GAN, C., LIU, Z., LIN, Q. and CUI, J. 2015. Synthesis and Antiproliferative Activity of Steroidal Thiosemicarbazone Platinum (Pt(II)) Complexes. Bioinorganic Chemistry and Applications, Volume 2015, Article ID 742592, 7 pages.

HWANG, D. F., ve NOGUCHI, T., 2007. Tetrodotoxin Poisoning. Advances In Food And Nutrition Research, 52: 141-236.

IARC, 2018. Cancer today. [online], http://gco.iarc.fr/today/home. [Ziyaret tarihi: 15 Mart 2018].

ILYIN, V. I., HODGES, D. D., WHITTEMORE, E. R., CARTER, R. B., CAI, S. X., WOODWARD, R. M., 2005. V102862 (Co 102862): a potent, broad-spectrum

state-dependent blocker of mammalian voltage-gated sodium channels. British Journal of Pharmacology, 144: 801-812.

JANSSON, P. J., KALINOWSKI, D. S., LANE, D. J. R., KOVACEVIC, Z., SEEBACHER, N. A., FOUANI, L., SAHNI, S., MERLOT, A. M., RICHARDSON D. R., 2015a. The renaissance of polypharmacology in the development of anti-cancer therapeutics: Inhibition of the "Triad of Death" in cancer by Di-2-pyridylketone thiosemicarbazones. Pharmacological Research, 100: 255–260.

JANSSON, P. J., YAMAGISHI, T., ARVIND, A., SEEBACHER N, GUTIERREZ E, STACY, A., 2015b. Di-2-pyridylketone-4,4-dimethyl-3-thiosemicarbazone (Dp44mT) overcomes multidrug resistance by a novel mechanism involving the hijacking of lysosomal P-glycoprotein (Pgp). J Biol Chem, 290(15): 9588–603.

JEAN-YVES, L. G., HALIMA, O-A., OLIVIER, S., PIERRE, B., AHMED, A., and CHRISTOPHE, V., 2007. Voltage-gated ion channels, new targets in anti-cancer research. Recent Patents on Anti-cancer Drug Discovery, 2: 189-202.

JOSEPH, M., SUNI, V., KRUP, M.R.P., NETHAJI, M., KISHORE, A., and BHAT, S. G., 2004. Structural, Spectral and Antimicrobial Studies of Copper (II) Complexes of 2- benzoylpyridine N (4)-cyclohexyl Thiosemicarbonoze. Polyhedron, 23(18): 3069- 3080.

KAGEYAMA, Y., HYOCHI, N., KIHARA, K., SUGIYAMA, and H., 2007. The androgen receptor as putative therapeutic target in hormone-refractory prostate cancer. Recent Patents on Anticancer Drug Discovery, 2: 203-211.

KAO, C. Y., 1972. Pharmacology Of Tetrodotoxin And Saxitoxin. In Federation Proceedings, 31(3): 1117-1123.

Kanser Hastalığı Konusunun Araştırılarak Alınması Gereken Önlemlerin Belirlenmesi. 2010. Türkiye Büyük Millet Meclisi Meclis Araştırması Komisyonu Raporu. P. 1-648.

KHANNA, C., ve HUNTER, K., 2005. Modeling metastasis in vivo. Carcinogenesis, 26(3): 513-523.

KOVACEVIC, Z., RICHARDSON, D.R., 2012. Targeting ıron in cancer cells: a new strategy to inhibit metastatic progression. Vitamins & Trace Elements, 1; e114.

KOVALA-DEMERTZİ, D., DOMOPOULOU, A., DEMERTZİS, A., M., VALE, G., and PAPAGEORGROU, A., 1997. Palladium(II) complexes of 2-acetylpyridine N(4)-methyl, N(4)-ethyl and N(4)-phenyl-thiosemicarbazones. Crystal structure of chloro(2-acetylpyridine N(4)-methylthiosemicarbazonato) palladium(II). Synthesis, spectral studies, in vitro and in vivo antitumour activity. Journal Of Inorganic Biochemistry, 68: 147-155.

KOVALA-DEMERTZI, D., DEMERTZIS, M. A., VARAGI, V., PAPAGEORGIOU, A., MOURELATOS, D., MIOGLOU, E., IAKOVIDOU, Z., KOTSIS, A., 1998. Antineoplastic and cytogenetic effects of platinum(II) and palladium(II) complexes with pyridine-2-carboxyaldehyde-thiosemicarbazone. Chemotherapy, 44(6):421-426.

KOVALA-DEMERTZI, D., DEMERTZIS, M. A., MILLER, J.R., PAPADOPOULOU, C., DODOROU, C. and FILOUSIS, G. 2001. Platinum(II) complexes with 2-acetyl pyridine thiosemicarbazone Synthesis, crystal structure, spectral properties, antimicrobial and antitumour activity. Journal of Inorganic Biochemistry, 86: 555–563.

KOVALA-DEMERTZI, D., PAPAGEORGIOU, A., PAPATHANASIS, L., ALEXANDRATOS, A., DALEZIS, P., MILLER, J.R. AND DEMERTZIS, M.A. 2009. In vitro and in vivo antitumor activity of platinum(II) complexes with thiosemicarbazones derived from 2-formyl and 2-acetyl pyridine and containing ring incorporated at N(4)-position: Synthesis, spectroscopic study and crystal structure of platinum(II) complexes with thiosemicarbazones, potential anticancer agents. European Journal of Medicinal Chemistry, 44: 1296–1302.

KRASOWSKA, M., GRZYWNA, Z. J., MYCIELSKA, M. E., and DJAMGOZ, M. B. A., 2009. Fractal analysis and ionic dependence of endocytotic membrane activity of human breast cancer cells. Eur Biophys J, 38: 1115–1125.

KULANDAIVELU, U., PADMINI, V. G., SUNEETHA, K., SHIREESHA, B., VIDYASAGAR, J. V., RAO, T. R., JAYAVEERA, K. N., BASU, A., JAYAPRAKASH, V., 2011. Synthesis, antimicrobial and anticancer activity of new thiosemicarbazone derivatives. Arch Pharm (Weinheim), 344(2): 84-90.

KUMAR, G. D. K., CHAVARRIA, G. E., CHARLTON-SEVCIK, A. K., ARISPE, W. M., MACDONOUGH, M. T., STRECKER, T. E., CHEN, S., SIIM, B. G., CHAPLIN, D. J., TRAWICK, M. L., PINNEY, K. G., 2010. Design, synthesis, and biological evaluation of potent thiosemicarbazone based cathepsin L inhibitors. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 20: 1415-1419.

KUMAR, V., ABBAS, A. K. and ASTER, J. C., 2015. Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease (Ninth edition.). Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders, 265-340.

KUNZELMANN, K., 2005. Ion channels and cancer. The Journal of Membrane Biology, 205(3): 159-173

KUNZELMANN, K., 2016. Ion channels in regulated cell death. Cellular and Molecular Life Sciences, 73(11-12): 2387-2403.

LANIADO, M. E., LALANI, E-N., FRASER, S.P., GRIMES, J.A., BHANGAL, G., DJAMGOZ, M. B. A., and ABEL, P.D., 1997. Expression and functional analysis of voltage-activated Na+ channels in human prostate cancer cell lines and their contribution to invasion in vitro. American Journal of Pathology, 150(4): 1213- 1221.

LE, N. T., RICHARDSON, D. R., 2014. Iron chelators with high antiproliferative activity up-regulate the expression of a growth inhibitory and metastasis suppressor gene: a link between iron metabolism and proliferation. Blood,104(9): 2967–2975.

LEONARD, G. D., FOJO, T, BATES, S. E., 2003. The role of ABC transporters in clinical practice. Oncologist, 8(5): 411–24.

LI, J., ZHENG, L. M, KING, I., DOYLE, T. W., and CHEN, S. H., 2001. Syntheses and antitumor activities of potent inhibitors of ribonucleotide reductase: 3-amino-4-methylpyridine-2-carboxaldehyde-thiosemicarbazone (3-AMP), 3-amino-pyridine-2-carboxaldehyde-thiosemicarbazone (3-AP) and its water-soluble prodrugs. Curr Med Chem, 59(8): 121-130.

MADEJA, Z., MIEKUS, K., CZERNIK, M., SROKA, J., and CZYZ, J., 2005. Contact stimulation of prostate cancer cell migration: The role of gap junctional coupling and migration stimulated by heterotypic cell-to-cell contacts of Dunning rat prostate cancer cells. Biol. Cell, 97(12): 893-903.

MARCIL, J., WALCZAK, J. S., GUINDON, J., NGOC, A. H., LU, S., and BEAULIEU, P., 2006. Antinociceptive effects of tetrodotoxin (TTX) in rodents. British Journal of Anaesthesia, 96(6): 76

MARUYAMA, Y., ONO, M., KAWAHARA, A., YOKOYAM, T., BASAKI, Y., and KAGE, M., 2006. Tumor growth suppression in pancreatic cancer by a putative metastasis suppressor gene Cap43/NDRG1/Drg-1 through modulation of angiogenesis. Cancer Res, 66(12): 6233–42.

MEHIK, A., 2001. Epidemiological and diagnostical aspects of prostatitis. Oulu University Press, ISBN 951-42-6506-8, Finland, 90s.

MIKI, J., ve RHIM, J.S., 2008. Prostate cell cultures as in vitro models for study of normal stem cells and cancer stem cells. Prostate Cancer and Prostatic Diseases, 11(1): 32-39.

MIYAZAWA, K., ve NOGUCHI, T., 2001. Distribution And Origin Of Tetrodotoxin. Toxin Reviews, 20(1): 11-33.

MOSMANN, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.J Immunol Methods, 16;65(1-2): 55-63.

NAKAJIMA, T., KUBOTA, N., TSUTSUMI, T., OGURI, A., IMUTA, H., JO, T., OONUMA, H., SOMA, M., MEGURO, K., TAKANO, H., NAGASE, T., and NAGATA, T., 2009. Eicosapentaenoic acid inhibits voltage-gated sodium channels and invasiveness in prostate cancer cells. Br J Pharmacol., 156(3): 420- 431.

NARAHASHI, T., 2008. Tetrodotoxin -A brief history. Neuromorphology. Prodeceedings of The Japan Academy, Series Physical and Biological Sciences, 84(5): 147–154.

NILIUS, B., ve DROOGMANS, G., 2001. Ion channels and their functional role in vascular endothelium. Physiological Reviews, 81(4): 1415-1459.

NOGUCHI, T., ve EBESU, J. S., 2001. Puffer Poisoning: Epidemiology and Treatment. Toxin Reviews, 20(1): 1-10.

NOGUCHI, T., ARAKAWA, O., and TAKATANI, T., 2006. TTX Accumulation In Pufferfish. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics,1(1): 145-152.

OLPE, H., KOLB, C. N., HAUSDORF, A., HAAS, H. L., 1991. 4-aminopyridine and barium chloride attenuate the antiepileptic effect of carbamazepine in hippocampal slices. Experientia, 47: 254-257.

ONKAL, R., ve DJAMGOZ, M.B.A., 2009. Molecular pharmacology of voltage-gated sodium channel expression in metastatic disease: Clinical potential of neonatal Nav1.5 in breast cancer. Eur J Pharmacol., 625(1-3): 206-219.

ONGANER, P. U., ve DJAMGOZ, M. B. A., 2005. Small-cell lung cancer (human): Potentiation of endocytic membrane activity by voltage gated Na+ channel expression in vitro. Journal of Membrane Biology, 204: 67-75.

ONGANER, P., ve DJAMGOZ, M. B. A., 2007. Epidermal growth factor potentiates in vitro metastatic behaviour of human prostate cancer PC-3M cells: involvement of voltage-gated sodium channel. Molecular Cancer, 6: 76.

ÖZALPAN, A., 2001, Temel Radyobiyoloji, 1. Baskı, Haliç Üniversitesi Yayınları, İstanbul, 975-8574-00-0

PAL, I., BASULI, F., and BHATTACHARYA, S., 2002. Thiosemicarbazone complexes of the platinum metals. A story of variable coordination modes. Proc. Indian Acad. Sci. (Chem. Sci), 114(4): 255-268.

PALMER, C. P., MYCIELSKA, M. E., BURCU, H., OSMAN, K., COLLINS, T., BECKERMAN, R., PERRETT, R., JOHNSON, H., AYDAR, E. And DJAMGOZ, M. B. A., 2008. Single cell adhesion measuring apparatus (SCAMA): application to cancer cell lines of different metastatic potential and voltage-gated Na+ channel expression. European Biophysics Journal, 37(4): 359–368.

PAN, H., ve DJAMBOZ, M. B. A., 2008. Biochemical constitution of extracellular medium is critical for control of human breast cancer MDA-MB-231 cell motility. J Membrane Biol, 223: 27–36.

PATEL, A.R., ve KLEIN, A.R., 2009. Risk factor for prostate cancer. Nat Clin Pract Urol., 6(2): 87-95.

PATEL, H. D. and SHAH, S. A., 2012. Synthesis and anti-cancer activity of new thiosemicarbazones of 1-(5-chloro1H-benzimidazol-2-yl) ethanone. Der Pharmacia Sinica, 3(2): 199-210.

PREUSSAT, K, BEETZ, C, and SCHREY, M., 2003. Expression of voltage-gated potassium channels Kv1.3 and Kv1.5 in human gliomas. Neurosci Lett., 346(1–2): 33–36.

QI, J., ZHENG, Y., QIAN, K., TİAN, L., ZHANG G.-X., CHENG, Z., and WANG, Y. 2017. Synthesis, crystal structure and antiproliferative mechanisms of 2-acetylpyridine-thiosemicarbazones Ga(III) with a greater selectivity against tumor cells. Journal of Inorganic Biochemistry, 177: 110–117.

REBOLLEDO, A. P., VIEITES, M., GAMBINO, D., PIRO, O. E, CASTELLANO, E. E., ZANI, C. L., SOUZA-FAGUNDES, E. M., TEIXEIRA, L. R., BATISTA, A. A., and BERALDO, H., 2005. Palladium (II) Complexes of 2-benzoylpyridine-derived Thiosemicarbazones: spectral characterization, structural studies and cytotoxic activity. Journal of Inorganic Biochemistry, 99(3): 698-706.

RICHARDSON, D. R., KALINOWSKI, D. S., RICHARDSON, V., SHARPE, P. C., LOVEJOY D. B., ISLAM, M., and BERNHARDT, P. V. 2009. 2-Acetylpyridine Thiosemicarbazones are Potent Iron Chelators and Antiproliferative Agents: Redox Activity, Iron Complexation and Characterization of their Antitumor Activity. J. Med. Chem., 52: 1459–1470.

RITCHIE, C. K., ANDREWS, L. R., THOMAS, K. G., TINDALL, D. J., and FITZPATRICK, L. A., 1997. The effects of growth factors associated with osteoblasts on prostate carcinoma proliferation and chemotaxis: Implications for the development of metastatic disease. Endocrinology, 138 (3): 1145-1149.

ROGER, S., BESSON, P., and GUENNEC, J., 2003. Involvement of a novel fast inward sodium current in the invasion capacity of a breast cancer cell line. Biochimica et Biophysica Acta, 1616(2): 107–111.

ROGER, S., ROLLIN, J., BARASCU, A., BESSON, P., RAYNAL, P., IOCHMAN, S., LEI, M., BOUGNOUX, P., GRUEL, Y., and LE GUENNEC, J.Y., 2007. Voltage- gated sodium channels potentiate the invasive capacities of human non-small-cell lung cancer cell lines. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 39(4): 774-786.

SARTORELLI, A. C., AGRAWAL, K. C., MOORE, E. C., 1971. Mechanism of inhibition of ribonucleoside diphosphate reductase by α-(N)-heterocyclic aldehyde thiosemicarbazones. Biochem. Pharmacol, 20: 3119-3123.

SCHREY, M., CODINA, C., KRAFT, R., BEETZ, C., KAL, R., W, S., and PATT, S., 2002. Molecular characterization of voltage-gated sodium channels in human gliomas. Neuroreport, 13(18): 2493-2498.

SCHORAH, C. J., 1999. Micronutrients, vitamins and cancer risk, Vit. Horm., 57: 1-23.

SCARDINO, P.T., ve KELMAN, J., 2005. Prostat Kitabı, Vatan Kitap, İstanbul, 975-885- 725-8.

SHARMA, N., and PATHAK, D. P., 2016. Combatting challenging aspects of cancer with thiosemicarbazones. Int J Pharm Pharm Sci, 8(8): 27-34.

SHIMIZU, H., ROSS, R. K., BERNSTEIN, L., YATANI, R., HENDERSON, B. E., MACK, T. M., 1991. Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles county. Br J Cancer, 63(6): 963-966.

SILVA, M. J. E., ALVES, A. J. and DO NASCIMENTO, S. C., 1998. Synthesis and Cytotoxic Activity of N-Substituted Thiosemicarbazones of 3-(3,4-Methylenedioxy) Phenylpropanal", Il Farmaco, 53(3): 241-243.

SIMARD, J., DUMONT, M., LABUDA, D., SINNETT, D., MELOCHE, C., EL-ALFY, M., BERGER, L., LEES, E., LABRIE, F., AND TAVTIGIAN, S. V., 2003. Prostate cancer susceptibility genes: lessons learned and challenges posed. Endocrine-Related Cancer, 10: 225–259.

SONTHEIMER, H., BLACK, J.A., and WAXMAN, S.G., 1996. Voltage-gated Na+ channels in glia: properties and possible functions. Trends Neurosci., 19(8): 325-331.

SU, W. TANG, Z., XIAO, Q., LI, P., QIAN, Q., LEI, X., HUANG, S., PENG, B., CUI, J., HUANG, C., 2015. Synthesis, structures, antiproliferative activity of a series of ruthenium(II) arene derivatives of thiosemicarbazones ligands. Journal of Organometallic Chemistry, 783: 10-16.

SUN, J., ZHANG, D., BAE, D.H., SAHNİ, S., JANSSON, P., ZHENG, Y., 2013. Metastasis suppressor, NDRG1, mediates its activity through signaling pathways and molecular motors. Carcinogenesis, 34: 1943–54.

TANAGHO, E. A., 2004. Embryology of the genitourinary system. Smith's General Urology, 16 Edition. New York, 18-30.

TAPON, N., ve ZIEBOLD, U., 2008. Invasion and metastasis: stem cells, screens and survival. EMBO Reports, 9(11):1078-1083.

TENG, Y. D., ve WRATHALL, J. R., 1997. Local blockade of sodium channels by tetrdotoxin ameliorates tissue loss and long-term functional deficits resulting from experimental spinal cord injury. The Journal of Neuroscience, 17(11): 4359-4366.

TERLAU, H.,ve STÜHMER, W., 1998. Structure and function of voltage-gated ion channels. Naturwissenschaften, 85: 437-444.

TUNCER, A.M., 2007. Türkiye'de kanser kontrolü, T.C. Sağlık Bakanlığı, Kanserle Savaş Dairesi Bşk. Yy., Ankara, 978-975-590-220-3.

YILDIRIM, S., ALTUN, S., GUMUSHAN, H., PATEL, A., and DJAMGOZ, M. B., 2012. Voltage-gated sodium channel activity promotes prostate cancer metastatis in vivo. Cancer Lett, 323(1): 58-61.

YU, F. H., ve CATTERALL, W. A., 2003. Overview of the voltage-gated sodium channel family. Genome Biology, 4: 207.

WALSH, K. B., WOLF, M. B., ve FAN, J., 1998. Voltage-gated sodium channels in cardiac microvascular endothelial cells. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 274: 506–512.

WAMIL, A. W., PORTET, C., JENSEN, P. K., SCHMUTZ, M., AND MCLEAN, M. J., 1991. Oxcarbazepine and its monohydroxy metabolite limit action potential firing by mouse central neurons in culture. Epilepsia, 32: 65–66.

WASZKIELEWICZ, A. M., GUNIA, A., SZKARADEK, N., SOCZYNSKA, K., KRUPINSKA, S., AND MARONA, H., 2013. Ion Channels as Drug Targets in Central Nervous System Disorders. Current Medicinal Chemistry, 20: 1241-1285.

WENGER, A. S., MICKEY, D. D., HALL, M., SILVERMAN, L. M., MICKEY, G. H., and FRIED, F. A., 1984. In vitro characterization of MAT-LyLu: a Dunning rat prostate adenocarcinoma tumor subline. The Journal of Urology, 131(6): 1232-1236.

WILLIAMS, B. L., 2010. Behavioral And Chemical Ecology Of Marine Organisms With Respect to Tetrodotoxin. Marine Drugs, 8(3): 381-398.

WOODHOUSE, E. C., CHUAQUI, R. F., and LIOTTA, L., 1997. General mechanisms of metastasis. Cancer Supplement, 80(8): 1529-1537.

WU, Z., YANG, Y., XIE, L., XIA, G., HU, J., WANG, S., and ZHANG, R., 2005. Toxicity and distribution of tetrodotoxin-producing bacteria in puffer fish Fugu rubripes collected from the Bohai Sea of China. Toxicon, 46(4): 471-476.

ZONA, C., TANCREDI, V., PALMA, E., PIRRONE, G. C., AVOLI, M., 1990. Potassium currents in rat cortical neurons in culture are enhanced by the antiepileptic drug carbamazepine. Can. J. Physiol. Pharmacol., 68: 545-547.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Pelin MÜJDECİ

Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti

Doğum Yeri ve Tarihi : KİLİS / 18.07.1989

Telefon : 0538 300 90 12

e-mail : pelin.mujdeci@hotmail.com

EĞiTiM

Derece		Tarih
Lise	:Şehit Emin Çelik Anadolu Lisesi Mersin/Mut	2006
Lisans	: Harran Üniversitesi Fen- Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Şanlıurfa/merkez	2014
Yüksek Lisans	: Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı- Şanlıurfa	2018

UZMANLIK ALANI

Hücre Biyolojisi : Hücre kültürü, Hücre canlılığı ve sitotoksisite testleri, in vitro yara iyileşme testleri, mitotik aktivite

YABANCI DiLLER: İngilizce

KATILDIĞI KONGRELER

III. BİYOSİDAL KONGRESİ

1.ULUSLARARASI KANSER VE İYON KANALLARI KONGRESİ